

Molekularbiologische Analyse
von Struktur/Funktions-Beziehungen
des Citrus Exocortis Viroid (CEV)
mit Hilfe gentechnologischer Methoden

Matthias Hillmann

Disbui. München

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Molekularbiologische Analyse von Struktur/Funktions-Beziehungen
des Citrus Exocortis Viroid (CEV)
mit Hilfe gentechnologischer Methoden**

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Matthias Hillmann

aus Hildesheim

München, 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.L.Sänger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L.Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 23.12. 87

Abkürzungen	1
1. EINLEITUNG	3
2. ZIELE DER ARBEIT	9
3. MATERIALIEN UND METHODEN	9
3.1. Textverarbeitung	9
3.2. Geräte	10
3.3. Enzyme	11
3.4. Reagentien	12
3.5. Radiochemikalien	13
3.6. DNA-Oligonukleotide	13
3.7. Puffer	14
3.8. Phenollösungen	15
3.9. Säulenmaterial	15
3.10. E.coli - Stämme	16
3.11. Medien und Agarplatten	16
3.12. Plasmide	17
3.13. Enzymatische Reaktionen	19
3.13.1. Abspaltung von 5'-Phosphatgruppen	19
3.13.2. Endmarkierung von DNA	20
3.13.3. Ligierung von DNA	21
3.13.4. Reverse Transkription	21
3.13.5. Synthese von ds DNA mit Klenow-Polymerase	23
3.13.6. Synthese von ds DNA- nach Gubler und Hoffmann	24
3.13.7. Transkription von DNA mit RNA-Polymerasen	24
3.13.7.1. SP6 - System	25
3.13.7.2. T3- bzw. T7- System	26
3.14. Restriktionsanalysen	26
3.15. Gelsysteme zur Auftrennung von Nukleinsäuren	27
3.15.1. Marker	27

3.15.2. Nichtdenaturierende Gele	28
3.15.2.1. Agarose-Gelelektrophorese	28
3.15.2.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	29
3.15.3. Denaturierende Gele	30
3.15.4. Bidirektionale Gele	33
3.16. Präparative Separation von Nukleinsäuren	34
3.16.1. FPLC-Trennung	34
3.16.2. HPLC-Trennung	35
3.17. E.coli Kulturen	37
3.17.1. Selektion	37
3.17.2. Dauerkulturen	38
3.17.3. Hauptkulturen	38
3.17.4. Vorbereitungen zur Transformation	39
3.17.4.1. CaCl ₂ - Methode	39
3.17.4.2. Hanahan- Methode	40
3.18. Plamidisolierung	43
3.18.1. Schnelltest	43
3.18.2. Analytische und präparative Plasmid- isolierung	44
3.18.3. Plasmidisolierung über Sephacryl S1000	46
3.19. Präparation von Einzelstrang-DNA mittels Helferphagen	49
3.20. Reinigung von Oligonukleotiden	49
3.21. Fällung von Nukleinsäuren	51
3.22. Nachweis von Nukleinsäuren	52
3.22.1. Ethidiumbromidfärbung	52
3.22.2. Silberfärbung	53
3.22.3. Autoradiographie	54
3.23. Elution von Nukleinsäuren	54
3.23.1. Diffusionselution	54
3.23.3. Elektroelution	55
3.23.2. Isotachophorese	56
3.24. Molekulare Hybridisierung	58
3.24.1. Herstellung der Hybridisierungsproben	59
3.24.2. Glyoxalierung der Nukleinsäuren	59
3.24.3. "Dot blot"-Analyse	60
3.24.4. "Northern blot"-Analyse	61
3.24.5. Molekulare Hybridisierung	61
3.25. Sequenzierungen	63
3.25.1. Chemische Methode nach Maxam-Gilbert	64
3.25.2. Enzymatische Methoden	65
3.25.2.1. Einzelstrang-DNA	65

3.25.2.2. Doppelstrang-DNA	65
3.25.3. Sequenzierung von RNA aus Pflanzen	70
3.26. Infektiositätstest	70
3.27. Sekundärstrukturberechnung	71
4. ERGEBNISSE	72
4.1. Klonierung des CEV	73
4.1.1. Strategie	74
4.1.1.1. Klonierungsmethode nach Gubler und Hoffmann	74
4.1.1.2. Methode der primerkontrollierten Viroid-cDNA- Synthese	76
4.1.2. Analytischer Ansatz	80
4.1.3. Präparativer Ansatz	80
4.1.4. Restriktionsanalyse der Teilkclone	80
4.1.5. Konstruktion eines Klons mit vollständigem CEV- Genom	82
4.1.6. Sequenzierung nach Maxam-Gilbert	84
4.1.7. Umklonierung in SP6- Vektoren	89
4.1.8. Infektiositäts-Versuche mit Pflanzen	90
4.2. Sequenzierung der Teilkclone	91
4.2.1. Auswahl der Sequenzierungs-Methode	91
4.2.2. Bestimmung der Mutationsverteilung beim CEV	94
4.3. Konstruktion von CEV - Monomeren im Plasmid Bluescribe	97
4.3.1. Auswahl der Klonierungs-Stelle im Plasmid	97
4.3.2. Klonierungsschema und Kriterien zur Neukonstruktion von CEV- Mutanten	99
4.3.3. Analyse der CEV- Mutanten	101
4.4. Synthese von CEV-spezifischer Transkript-RNA mit Hilfe der T3/T7- RNA Polymerase Systems	104
4.5. Infektiositätstests mit CEV-CG1 auf Gynura und Tomate	105
4.6. Konstruktion von Dimeren	107
4.7. Infektiositätstests mit CEV- Mutanten auf Tomate	107
4.7.1. Einfluß der Mutationen auf die Infektiosität und Virulenz	110
4.7.2. Vergleich mit bisher bekannten CEV-Varianten	111

4.8. Ergebnisse der Berechnung der Sekundärstruktur der Neu-Konstruierten Mutanten	114
4.9. Sequenzierung der Viroid - Nachkommenschaft der CEV- Mutanten	117
4.9.1. Aufreinigung von Viroid-RNA	118
4.9.2. Selektion von Primern	118
4.9.3. Sequenz der Nachkommenschaft der CEV- Mutanten	120
5. DISKUSSION	124
5.1. Analyse der Sequenzvariation des CEV	124
5.1.1 Verteilung der Mutationen auf der RNA	126
5.1.2. Mögliche Ursachen der Sequenzvariation	126
5.1.3. Zeitlicher Verlauf der Sequenzvariation	128
5.2. Infektionsstudien mit klonierten CEV- Varianten	129
5.2.1. Infektiositätsunterschiede monomerer und dimerer Transkript RNAs	129
5.2.2. Zusammenhang zwischen Primärstruktur, Replikabilität und Infektiosität	130
5.2.3. Beziehungen zwischen der Sequenz und der Virulenz des CEV	134
5.2.4. Die Problematik der Berechnung von RNA Sekundärstrukturen	135
5.3. Erhaltung und Reversion von Mutationen	137
6. ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT	138
7. LITERATUR	139

Abkürzungen

Abb	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bis	N,N'Methylenbisacrylamid
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CEV	Citrus Exocortis Viroid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Ci	Curie
cpm	Impulse pro Minute
CSV	Chrysanthemum Stunt Viroid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds	doppelsträngig
DTT	1,4 Dithiothreit
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure (Titriplex III)
EtBr	Ethidiumbromid
G/V	Gewichtsanteile pro Volumen
IAA	Isoamylalkohol
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalacto-pyranosid
NTA	Nitrilotriessigsäure
(d)NTP	(Deoxy) Ribonukleosid-Triphosphat
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PEG	Polyethylenglykol
PFU	Plaque forming units
PSTV	Potato Spindle Tuber Viroid
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
TEMED	N,N,N',N'Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute
V/V	Volumenanteile
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-beta-D galactopyranosid

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Viroidforschung des Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter Anleitung von Prof.Dr.H.L.Sänger angefertigt, dem ich für das Thema, die Bereitstellung eines mit Geräten und Material gut ausgestatteten Arbeitsplatzes und für sein fortwährendes Interesse an der Entwicklung dieser Arbeit danke.

Den Mitarbeitern dieser Abteilung danke ich für das gute Arbeitsklima sowie für die ständige Bereitschaft zur Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt hier Herrn Dr. Martin Tableder, der mich zu Beginn der praktischen Arbeit in alle wesentlichen Arbeitsweisen der Gentechnologie eingewiesen hat und mir bei Problemen stets hilfreich zur Seite stand. Herrn Dr. Mühlbach sowie Herrn Dr. Schiebel danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts. Herr Bernd Haas hat mich freundlicherweise in die Bedienung eines von ihm entworfenen Grafikprogrammes eingewiesen.

Bei der Belegschaft des Gewächshauses möchte ich mich für die Durchführung der Infektiositätstests und für die Pflege der vielen Versuchspflanzen bedanken.

Herrn Prof.Dr.E.L.Winnaker bin ich für die Betreuung dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet.



1. Einleitung

Viroide sind die kleinsten zur Zeit bekannten infektiösen Krankheitserreger. Es sind hüllproteinfreie, kleine RNA- Moleküle, die bisher nur bei höheren Pflanzen gefunden wurden. Sie können bei Kulturpflanzen wie Kartoffeln, Tomaten, Chrysanthemen, Gurken, Hopfen, Avocado, Zitrusgewächse und Wein Schäden von großem wirtschaftlichen Ausmaß verursachen (neuere Übersichten siehe Sänger, 1982 und 1984; Diener, 1984; Riesner und Gross, 1985; Semancik, 1987). Seit ihrer erstmaligen Beschreibung Anfang der 70er Jahre konnten Viroide inzwischen als die Ursache von etwa zwanzig Pflanzenkrankheiten erkannt werden. Eine Übersicht über die bisher sequenzierten Viroide und deren Größe, über die partiell charakterisierten Viroide sowie über die Art der von ihnen induzierten Symptome gibt *Tabelle 1*. Aufgrund ihrer Größe und ihrer Sequenzhomologie zum PSTV und zueinander lassen sich die bisher sequenzierten Viroide in fünf Gruppen einteilen. Die größte und inzwischen am besten charakterisierte Gruppe stellt die PSTV- Gruppe dar, der fünf Viroide angehören.

Die Viroide unterscheiden sich in auffälliger Weise in der Breite ihres Wirtsbereiches . Während das CCCV und das ASBV bisher nur auf ihre namengebenden Primärwirte übertragen werden konnten, läßt sich das PSTV und das CEV und seine Verwandten auf eine große Zahl verschiedener nicht miteinander verwandter Wirte übertragen. Die von Viroiden induzierten Krankheitsbilder sind ebenfalls sehr unterschiedlich. Während bei einigen Pflanzenarten der Viroidbefall innerhalb kurzer Zeit zu Wachstumshemmungen oder sogar zum Absterben der Pflanze führen kann, sind auf anderen Pflanzen keinerlei Symptome sichtbar, obwohl im Pflanzengewebe hohe Viroidkonzentrationen nachweisbar sind(Diener, 1979).

Bedingt durch ihre spezielle Nukleotidsequenz und ihre Zirkularität sind alle Viroide sehr stark selbstkomplementär und daher in der Lage, intramolekulare Basenpaarungen auszubilden. Innerhalb der PSTV- Gruppe beträgt der Anteil gepaarter Basen etwa 70 %. Die daraus resultierende rigide, stäbchenförmige Gestalt konnte im Elektronenmikroskop nachge-

Tabelle 1:

Zusammenstellung der bisher bekannten Viroide, ihrer Wirtspflanzen sowie der durch sie verursachten Symptome

Gruppe	Viroid	Abk.	Anzahl der Nukleotide	Sequenzhomologie zu PSTV	Wirtspflanze	Symptome	Literatur
I	Potato Spindle Tuber Viroid	PSTV	359	100 %	Solanum tuberosum	Stauchung Epinastie Blattdeformation Nekrosen	Gross et al., 1978
	Tomato Planta Macho Viroid	TPMV	360	83	Lycopersicon esculentum		Kiefer et al., 1983
	Tomato Apical Stunt Viroid	TASV	360	73	Lycopersicon esculentum		Kiefer et al., 1983
	Chrysanthemum Stunt Viroid	CSV	354	73	Chrysanthemum sp.		Haseloff und Symons, 1981
			356	69			Gross et al., 1982
	Citrus Exocortis Viroid	CEV	368-375	73 ¹⁾	Citrus medica	Nekrosen	Gross et al., 1982
							Visvader et al., 1982
II	Hop Stunt Viroid	HSV	297	55	Humulus lupulus		Ohno et al., 1983
	Cucumber Pale Fruit Viroid	CPFV	303	55	Cucumis sativus		Sano et al., 1984
			301		Benincasa		Puchta et al., in prep.
	Grapevine Viroid	GV	297	-	Wein		Sano et al., 1986
III	Avocado Sunblotch Viroid	ASBV	247	18	Persea americana	Variegation	Symons, 1981
IV	Coconut Cadang Cadang Viroid	CCCV	246, 287 492, 574	11	Cocos nucifera	Vergilbung	Haseloff et al., 1982
V	Hop Latent Viroid	HLV	256	-	Humulus lupulus	keine	Puchta et al., in prep.
VI	Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid	CCMV	?	?	Chrysanthemum sp.	Vergilbung	Romane und Horst, 1975
	Burdock Stunt Viroid	BSV	?	?	Arctium lappa	Stauchung	Chen et al., 1983

¹⁾ Homologie der Spezies CEV-A zu PSTV

wiesen werden (Sänger et al., 1976; McClements und Kaesberg, 1977). Diese Stäbchenform ist auch nach Berechnungen unter thermodynamischen Gesichtspunkten die stabilste Sekundärstruktur. Abb. 1 zeigt die Struktur des in der vorliegenden Arbeit untersuchten CEV.

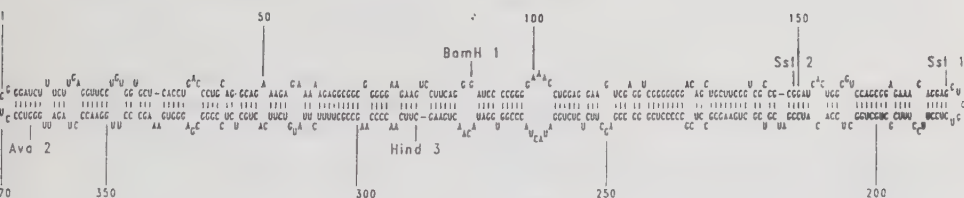


Abbildung 1: Darstellung der Primärstruktur des CEV in seiner nach thermodynamischen Parametern berechneten Sekundärstruktur.

Die Positionen der Erkennungsstellen jener Restriktionsenzyme, die im Verlauf der Klonierung verwendet wurden, sind eingezeichnet. Die Numerierung der Nukleotide erfolgte nach einem von Gross et al. (1978) vorgeschlagenen System. Doppelsträngige Bereiche, sogen. Helices, wechseln mit ungepaarten Regionen, den Loopstrukturen. Am äußeren "Rand" des Moleküls befindet sich jeweils ein "Hairpin". Eine Tertiärstruktur-Faltung konnte bei Viroiden bisher nicht nachgewiesen werden (Riesner und Gross, 1985).

Im Gegensatz zu Viren enthält das Viroidgenom keinerlei genetische Information zur Synthese von Proteinen oder Peptiden. Außerdem fehlen ihm das eukaryotische Initiationskodon AUG sowie Sequenzen zur Bindung an Ribosomen; mehrere Stop-Codons der Sequenz UGA bzw. UAG sind in unregelmäßiger Weise auf dem Viroidmolekül verteilt. Schließlich konnten auch mit Viroid-RNA bei in vitro Translationsexperimenten keine viroidspezifischen Peptidprodukte erhalten werden (Davies et al., 1974; Hall et al., 1974). Daher sind die Viroide hinsichtlich ihrer Replikation vollständig auf die Enzyme der

Wirtspflanze angewiesen. Die Replikation des PSTV ist am besten untersucht. In Abb.2 ist ein hypothetisches Schema zum Ablauf der Replikation dargestellt.

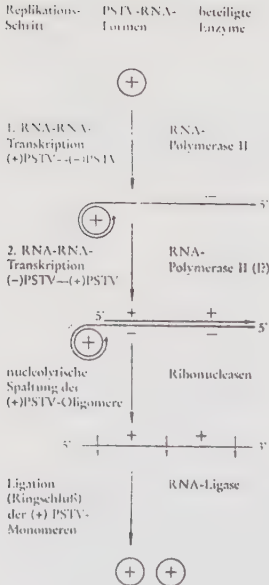


Abbildung 2: Hypothetisches Diagramm zur Replikation von PSTV

Die Viroid-RNA, ihre auftretenden Zwischenstufen und die vermuteten Replikationskomplexe sind schematisch dargestellt. Die beteiligten Enzyme sind den jeweiligen Reaktionsschritten zugeordnet.

Es konnte gezeigt werden, daß sie innerhalb der Zellkerne der Wirtszellen stattfindet und vollständig über RNA Formen verläuft. Dabei wird die zirkuläre RNA des Viroids zunächst durch die DNA-abhängige RNA Polymerase II und wahrscheinlich mittels einem "rolling circle"- Mechanismus in oligomere (-) RNA Transkripte überschrieben. An diesen (-) RNAs wird, vermutlich wiederum mit Hilfe des gleichen Enzyms, ein oligomerer (+) RNA Strang synthetisiert, der dann durch Ribonukleasen an bestimmten Stellen in monomere Einheiten gespalten wird.

Aus diesen Monomeren entstehen dann mit Hilfe der RNA Ligase wieder jene zirkulären Viroidmoleküle, die sich im

infizierten Gewebe ansammeln und eine neue Replikation einleiten können (Sänger, 1984; Branch und Robertson, 1984; Mühlbach, 1987). Die Replikationsintermediate beider Polaritäten konnten in Gewebeextrakten PSTV-, CEV-, HSV-, ASBV- und CCCV-infizierter Pflanzen durch molekulare Hybridisierung nachgewiesen werden (Grill und Semancik, 1978; Haseloff et al., 1982; Ishikawa et al., 1984; Hutchins et al., 1985a; Symons et al., 1985). Durch Experimente mit Extrakten aus Zellkernen konnte weiterhin gezeigt werden, daß in vitro synthetisierte oligomere Viroid (+) RNA in vitro zu zirkulären, monomeren Viroiden prozessiert werden kann (Tsagris et al., 1987).

Es ist noch weitgehend unbekannt, auf welche Weise Viroide mit ihren Wirtspflanzen interagieren und wie sie die beobachteten Symptome auslösen. Da Viroide für keinerlei Proteine kodieren, muß ihre RNA selbst mit bestimmten Wirtskomponenten in Wechselwirkung treten und so die Krankheit induzieren. Neben den in Tabelle 1 aufgeführten, mit dem bloßen Auge sichtbaren Symptomen verursachen Viroide natürlich auch noch eine Reihe von unterschiedlichen cytopathologischen, im Mikroskop sichtbare Symptome wie z.B. Verformungen von Zellwänden und von Chloroplasten mit ihren Thylakoidmembranen (zur Übersicht siehe Wahn et al., 1980; Sänger, 1982; Semancik, 1987). Obwohl Viroide nicht in der Lage sind, für irgendwelche Proteine zu kodieren, wurde in viroidinfizierten Pflanzen dennoch die Anhäufung bestimmter Proteine beobachtet (Camacho-Henriquez und Sänger, 1981; Conejero und Semancik, 1977; Lucas et al., 1985; Nassuth und Sänger, 1986). Es stellte sich jedoch heraus, daß es sich dabei um wirtskodierte Proteine handelt und daß dieser Effekt nicht spezifisch für Viroide ist, da er auch nach Virus- oder Pilzinfektionen auftritt. Es ist bisher nicht gelungen, auf molekularer Ebene eine Viroid-spezifische proteinchemische Veränderung in der Pflanze nachzuweisen.

Ein interessanter, aber völlig anderer Zugang zum molekularen Verständnis des Pathogenitätsmechanismus ergab sich aus Untersuchungen von verschiedenen Feldisolaten des PSTV und CEV. Es hat sich nämlich zunächst im Fall des PSTV gezeigt,

daß die Primärstruktur und die daraus resultierende Sekundärstruktur diverser PSTV-Feldisolate mit unterschiedlicher Virulenz mit der Ausprägung und der Stärke der Krankheitssymptome korreliert werden kann (Schnölzer et al., 1985). Die Nukleotidsequenz dieser Isolate ist keineswegs streng konserviert, sondern es gibt vielmehr einen Bereich, in dem Mutationen bevorzugt auftreten. Der Bereich wurde als "Virulenzmodulierende" (VM) Region bezeichnet. Diese Region befindet sich in der linken Hälfte des Viroidmoleküls; in seinem mittleren Teil hingegen treten keine Mutationen auf. Er ist mit Ausnahme des ASBV in allen Viroiden enthalten und wird deshalb als die "zentral konservierte" (CC) Region bezeichnet. Die thermodynamische Charakterisierung der VM-Region des PSTV hat ergeben, daß diese mit zunehmender Virulenz des Isolates in zunehmenden Maß thermodynamisch instabiler wird und somit in der Lage ist, leichter in Wechselwirkung mit den noch unbekannten Ziel-Komponenten der Wirtspflanze zu treten. Die Kettenlänge der PSTV Moleküle wird interessanterweise konstant gehalten, denn sie bestehen alle aus 359 Nukleotiden.

Eine völlig andere Situation findet man im Fall von CEV realisiert. Auch hier wurden Isolate gefunden, die verschiedenen starke Krankheitssymptome verursachen (Gross et al., 1982; Visvader et al., 1982; Haas, unpubliziert). Vor allem unterscheidet sich das CEV vom PSTV in der Weise, daß die Kettenlänge je nach Isolat zwischen 368 und 375 Nukleotiden schwanken kann. Außerdem ist beim CEV die unterschiedliche Ausprägung der Krankheitssymptome nicht ganz so differenziert zu diagnostizieren, wie dies beim PSTV auf Tomate und Kartoffel der Fall ist. Bei CEV-infizierten Orangenbäumen konnten bisher nur milde oder starke Symptome beobachtet werden, wobei sich die milden Symptome vor allem im Zwergwuchs der Orangen zeigten. Da diese Bäume weniger Platz benötigen und schneller Früchte tragen sowie leichter zu ernten sind (Cohen, 1968; Cary, 1977), wurde bereits erwogen das entsprechende CEV-Isolat gezielt zur Erzeugung von zwergwüchsigen Orangen zu verwenden. Aus Gründen der möglichen Mutation des CEV zu virulenten Isilaten ist der Einsatz solcher milden Isolate aus epidemiologischen Gründen allerdings höchst bedenklich.

Beim CEV wurde eine weitere Komplikation beobachtet, die beim PSTV nicht auftritt. Während in den Feldisolaten des PSTV immer nur eine Viroid- Variante enthalten war, konnte beim CEV gezeigt werden, daß eine Präparation isolierter Viroid-RNA stets aus einem Gemisch mehrerer Mutanten besteht, die sich nur in wenigen Nukleotiden voneinander unterscheiden (Visvader et al., 1985). Daher war es in diesem Fall nicht möglich, eine eindeutige Korrelation zwischen der Pathogenität und Struktur des CEV abzuleiten. Ein solcher Zusammenhang läßt sich nur mit Hilfe von genetisch einheitlichem Material ermitteln. Hier ergibt sich nun ein Ansatzpunkt, um mit Hilfe gentechnologischer Methoden einen Zugang zu diesem Problemkreis zu eröffnen, denn sie erlauben es, bestimmte Sequenzvarianten in reiner Form zu erhalten und damit Aussagen über die Beziehung zwischen der Struktur dieses Varianten und ihren biologischen Funktionen zu gewinnen. Dies war denn auch das Ziel der vorliegenden Arbeit.

2. Ziele der Arbeit

Ausgehend von einer aus Citrus aufgereinigten CEV-RNA sollte zunächst das vollständige Genom dieses Viroids in einer Form molekular kloniert werden, die zur Auslösung einer CEV-Infektion auf verschiedenen Testpflanzen in der Lage ist. Nach Erreichen dieses Zieles sollten dann folgende Experimente und Analysen durchgeführt werden:

a) Entwicklung einer CEV-spezifischen Hybridisierungsprobe, mit deren Hilfe der Viroidgehalt verschiedener Pflanzenarten bestimmt werden kann. Dies ist deshalb erforderlich, weil mit ihrer Hilfe CEV-Infektionen schnell und zuverlässig erkannt werden können, auch wenn sie keine sichtbaren Krankheitssymptome verursachen.

b) Ermittlung der Mutations-Verteilung und Mutations-Häufigkeit innerhalb der Nachkommenschaft, die nach der Inokulation mit dem klonierten CEV synthetisiert wird.

c) In vitro Synthese von RNAs der klonierter Varianten des CEV und Inokulation von Testpflanzen mit diesen Transkripten, um mit diesem molekular einheitlichen Material Zusammenhänge zwischen der Primär- und Sekundärstruktur des CEV und seiner Replikabilität, Virulenz und Wirtsspezifität nachzuweisen. Dabei sollte auch geklärt werden, ob die Auslösung einer Infektion und die Ausprägung von Symptomen nur von einer Sequenzvariante abhängt oder ob dafür mehrere Varianten erforderlich sind.

d) Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der Entstehung von Sequenz-Heterogenitäten während der CEV Replikation in der Pflanze aus dem zur Inokulation verwendeten molekular homogenen Ausgangsmaterial.

3. Materialien und Methoden

3.1. Textverarbeitung

Die vorliegende Dissertation wurde unter Verwendung des Textprogramms "MS-WORD 3.01" der Fa. Microsoft (Aschheim),

verschiedener Personal-Computer sowie eines Laserdruckers geschrieben. Die Grafiken wurden mit den Programmen In*a*Vision von Micrografx, Inc. (Greenville) sowie Autocad der Fa. Autodesk AG (Schweiz) erstellt. Das Layout einiger Seiten wurde mit dem Programm PageMaker von Aldus gestaltet. Englische Fachausdrücke wurden nur dann übersetzt, wenn dies sinnvoll und ohne Entstellung des sachlichen Wortinhalts möglich war.

3.2. Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet :

Zentrifugen:

Eppendorf Zentrifugen 5414 und 5415
Sigma 2MK Kühlzentrifuge
Haereus Christ Minifuge-2
Sorvall Superspeed RC2B
Heraeus Christ Cryofuge 6-4S
Beckmann LB 8-70 Ultrazentrifuge
Speed-Vac Concentrator: Uni Equip, Savant Instruments Inc.

Szintillationszähler:

Packard TriCarb 460C Automatic

Homogenisator:

Ultraturrax, Fa. Jahne&Kunkel

"Dot blot"-Apparatur:

Hybri-Dot, Fa. Gibco-BRL

Mischapparaturen:

Vortex-Genie, a. Scientific Industries, Bohemia N.Y., USA;
Paramix, Fa. Julabo

UV- Transilluminator:

Cromato-Vue , Fa. Ultra-Violet Products mit je 254, 306 und 366 nm UV-Fluoreszenzstrahlung

Wärmeinkubationsschrank für Hybridisierungen:

Fa. Bachhofer

HPLC Anlage

Serie 215 der Fa. LKB

3.3. Enzyme

Die Enzyme wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Boehringer, Mannheim:

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm

Lysozym aus Hühnereiweiß

RNase A aus Rinderpankreas

Restriktionsendonukleasen Bgl I, Kpn I

GIBCO/BRL, Eggenstein:

Restriktionsendonukleasen Hinf I, Sma I, Sst II

M-MLV Reverse Transkriptase

Life Sciences, St Petersburg, USA:

AMV Reverse Transkriptase

New England Biolabs, Schwalbach bei Frankfurt:

T7 RNA Polymerase

NEN, Dreieich:

T4 Polynukleotidkinase

Renner, Dannstadt-Schauernheim:

DNA Polymerase I, großes Fragment aus E. coli (Klenow-Fragment)

T4 DNA Ligase

Restriktionsendonukleasen BamH I, EcoR I, Hind III, Pst I, Pvu I, Xba I

VCS, San Diego, USA:

T3 RNA Polymerase

3.4. Reagentien

Die üblichen Laborchemikalien stammten, soweit bei den Arbeitsmethoden nicht anders aufgeführt, von Merck, Darmstadt.

Für besondere Zwecke wurden Reagentien folgender Herkunft eingesetzt:

Zur Sequenzierung nach Maxam-Gilbert (1980):

"Carrier-DNA": Kalbsthymus DNA Typ I	Sigma, München
"Carrier-RNA": tRNA aus E.coli MRE 600	Boehringer,
Piperidin, Grade I	Sigma,
Dimethylsulfat (zur Synthese)	Merck-Schuchart, Hohenbrunn,
Ameisensäure p.a.	Merck,
Natriumkakodylat x 3 H ₂ O	Fluka; Neu-Ulm,
Hydrazin, wasserfrei, purum	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol purissimum	Roth,

Für Polyacrylamidgele wurden Materialien der Fa. Biorad, München, verwendet:

Acrylamid, Bisacrylamid, TEMED, Ammoniumperoxodisulfat.

Zur Herstellung von Agarosegelen wurde von Gibco/BRL, eingesetzt:

Agarose, "Electrophoresis grade"

Agarose, "Low melting point, electrophoresis grade"

Weitere Spezialreagentien:

gamma-Aminocapronsäure	Sigma,
Antibiotika	Sigma,
BSA, nukleasefrei	Gibco/BRL,
(deoxy-) Ribonukleosid-Triphosphate	Boehringer,
(deoxy-) Ribonukleosid-Triphosphate	
zur Sequenzierung	Pharmacia,
DMSO (Uvasol)	Merck,
Ethidiumbromid	Boehringer,

Ficoll 400	Pharmacia,
Formamid (für Auftragspuffer)	Gibco/BRL,
Formamid (für Hybridisierungszwecke und HPLC- Anwendungen)	Merck,
gamma-Methacryloxypropyltrimethylsilan (Silan GF 31)	Wacker Chemie,
IPTG	Biomol, Ilvesheim
Polyvinylpyrrolidon	Sigma,
X-Gal	Biomol,

3.5. Radiochemikalien

Die Radiochemikalien alpha-³²P -dATP, alpha-³⁵S-ATP, gamma-³²P-ATP sowie alpha-³²P-UTP wurden von Amersham, Braunschweig bezogen.

3.6. DNA-Oligonukleotide

Im Laufe der Arbeit wurden folgende viroidspezifische DNA-Primer verwendet, deren Sequenz jeweils in 5'-3' Richtung angegeben ist. Sie wurden freundlicherweise in der Abteilung von Prof. Oesterheld am Max-Planck-Institut für Biochemie auf einem DNA-Syntheseautomaten Modell 380 der Fa. Applied Biosystems hergestellt.

P14A: dGCACCACAGG AACC

P15A: dCTCCAGGTTT CCCC

P15B: dGTATCCACCG GGTA

PHH16: dGGGGTTGAAG CTCAG

PHR16: dCTGAAGCTTC AACCCC

PBR16: dCCTTCAGGGA TCCCCG

PM1-21: dCCTGTTTCTC CGCTGGACGC C
 PM2-21: dGGGTCCAAG GGCTTTCACC C
 PM3-26: dGGGCGAGGCG CTTCAGCGAC GATCGG
 PM4-21: dCCTCAAGAAA GATCCCGAGG G

3.7. Puffer

Nachfolgend sind nur diejenigen Puffer aufgelistet, die im Rahmen der Arbeit breitere Verwendung gefunden haben. Selten verwendete und spezielle Puffer sind unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

TE- Puffer

Tris/HCl pH 8.0	10 mM
EDTA pH 8.0	1 mM

TEMS- Puffer

Tris pH 7.5	100 mM
NaCl	100 mM
HCl	75 mM
EDTA	10 mM
2- Mercaptoethanol	10 mM

1 M TBE- Puffer

Tris	1 M
Borsäure	830 mM
EDTA	10 mM

Es ergibt sich automatisch ein pH- Wert von 8.3

20 x SSC

NaCl	3 M
Natriumcitrat	0,3 M

Einstellen des pH-Wertes mit NaOH auf 7.0

50 x Denhardt's

Ficoll 400	1 %
Polyvinylpyrrolidon	1 %
BSA	1 %

3.8. Phenollösungen

Die nachfolgend aufgeführten Phenollösungen wurden zur Extraktion von Nukleinsäuren aus Blättern sowie zur Entfernung von Proteinen nach Enzymbehandlung von DNA und RNA verwendet.

Extraktionsphenol:

1 kg kristallines Phenol
1g 8-Hydroxychinolin
250 ml Chloroform
300 ml TEMS

Beim Stehenlassen über Nacht erhält man eine klare Lösung.

Phenollösung:

1 kg Phenol
1g 8-Hydroxychinolin

Nach zweimaliger Äquilibrierung des Phenols mit dem gleichen Volumen 1M Tris/HCl pH 8 wurde noch dreimal mit 1X TE ausgeschüttelt. Die so erhaltene Phenollösung wurde unter 1X TE in kleinen Volumina bei 20°C aufbewahrt. Hiermit wurden überwiegend kleinvolumige RNA- haltige Proben behandelt.

3.9. Säulenmaterial

Folgende Säulenmaterialien wurden verwendet:

Von Pharmacia, Freiburg:

DEAE-Sephadex A 25
Sephadex G 25 fine
Sephacryl S 1000 superfine

Von Biorad, München:

Biogel A 05 m, 100 - 200 mesh

Von Merck, Darmstadt:

TSK-HW 65
TSK-HW 75

Von Diagen, Düsseldorf:

Nucleogen DEAE 500

3.10. E.coli - Stämme

Im Rahmen der Untersuchungen wurden die folgenden E.coli Stämme (nach Yanisch-Peron et al. 1985) verwendet:

JM 83: ara, delta(lac-proAB), rpsL(=strA), phi80, lacZ,delta M15

JM 101: r+, m+, recA+, supE, thi, delta(lac-proAB), (F', trad36, pro AB, lacIqZ delta M15)

JM 109: r-, m+, recA-, endA 1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA 1, lamda-, delta(lac-proAB), (F', trad36, proAB, lacIqZ delta M15)

3.11. Medien und Agarplatten

Die Grundstoffe für Medien stammten von der Fa. Gibco, Karlsruhe:

Caseinhydrolysat Peptone No 20

Hefe Extrakt

Agar (Bacteriological grade)

Falls dies im weiteren Text nicht ausdrücklich erwähnt wird, hatten die verwendeten Medien folgende Zusammensetzung:

Vollmedium

Caseinhydrolysat	1 %
Hefe Extrakt	0.5 %
NaCl	1 %
Glucose	0.1 %

M9- Medium

Na ₂ HPO ₄	0.6 %
KH ₂ PO ₄	0.3 %
NaCl	0.05 %
NH ₄ Cl	0.1 %

Die weiteren Bestandteile werden erst nach dem Autoklavieren zugesetzt:

MgSO ₄	2 mM
CaCl ₂	0.1 mM
Glucose	0.2 %

M9CA- Medium: Enthält zusätzlich zum M9- Medium 0.2 % Caseinhydrolysat.

Zur Herstellung der Agarplatten wurde den entsprechenden Medien vor dem Autoklavieren 1.5 % Agar zugesetzt. Nach dem Abkühlen auf ca. 45°C wurden die erforderlichen Antibiotika und Reagentien zugesetzt und das Medium in einer sterilen Werkbank in Petrischalen gegossen.

Antibiotikum: Ampicillin 100 ug/ml

3.12. Plasmide

Zur Klonierung des CEV wurde das Plasmid pUC8 (Viera und Messing, 1982) verwendet. Für die Erzeugung von radioaktiven Proben zur molekularen Hybridisierung sowie zur in vitro Transkription von insertierter CEV-DNA mit phagenkodierten DNA-abhängigen RNA Polymerasen wurden die Vektoren pSP64, pSP65 (Melton et al., 1984) sowie Bluescribe M13+ (VCS, General Protocol, 1985) verwendet. Der letztgenannte Vektor diente auch zur Konstruktion der zusammengesetzten monomeren und dimeren CEV-Mutanten.

Das Plasmid pUC8:

Das Plasmid pUC8 hat eine Länge von 2686 Bp. Der Replikationsursprung ist so modifiziert, daß innerhalb der Bakterienzelle etwa 300 Kopien auftreten. Es besitzt außerdem das Ampicillin-Resistenz-Gen von pBR322 sowie Teile der lac-Region von M13mp8. Diese lac-Region enthält die Sequenz für die ersten 146 N-terminalen Aminosäuren des beta-Galactosidase-Gens (lac Z). Innerhalb des kodierenden Bereichs dieses Genfragments befindet sich ein 54 Bp großer, synthetisch hergestellter Polylinker mit 13 verschiedene hexanukleotid-spezifischen Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen die sog. "Multiple Cloning Site". Die verwendeten E.coli-Stämme besitzen ebenfalls ein Fragment des lac Z-Gens, in dem allerdings die kodierende Sequenz für das amino-terminale Ende des Enzyms fehlt. Enthält der Wirt das Plasmid, kommt es zur "Komplementation", d.h., es entsteht eine funktionsfähige beta-Galactosidase. Durch Zugabe eines Induktors (Isopropyl-

beta-D-thiogalacto-pyranosid =IPTG) kann ihre Biosynthese induziert werden. Ein chromogenes Substrats der beta-Galactosidase ist 5-Brom-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranosid (X-Gal). Bakterien, die das Plasmid enthalten, bilden auf Kulturplatten, die IPTG und X-Gal enthalten, blaue Kolonien aus; Bakterien, die das Plasmid mit einem in die "Multiple Cloning Site" eingefügten "Insert" enthalten, entwickeln hingegen Kolonien ohne Farbe. Bei ihnen ist die "Komplementation" nicht mehr möglich, weil das amino-terminale Ende des Enzyms nicht gebildet worden ist. Dies erhöht die Schnelligkeit des "Screening" der Kolonien, da nur solche Klone weiter untersucht werden, die farblos geblieben sind.

Die Plasmide pSP64 und pSP65:

Diese Plasmide leiten sich von pUC12 ab. Unmittelbar vor die Polylinkerregion wurde ein DNA- Fragment einkloniert, das den Promoter für die SP6 RNA Polymerase enthält. Diese Polymerase ist hochspezifisch für ihren Promoter. Die Transkription beginnt sechs Nukleotide vor dem Anfang des Polylinkers, so daß nach Linearisierung des Plasmides auf der stromabwärts vom Promoter gelegenen Seite außer der insertierten DNA nur wenig Fremdsequenzen mittranskribiert werden. Das Plasmid pSP65 enthält den Polylinker in entgegengesetzter Orientierung wie pSP64. Auf diese Weise ist es mit diesem Plasmidpaar möglich, von einer beliebigen DNA nach ihrer Klonierung in den entsprechenden Vektor durch in vitro Transkription RNA-Transkripte in beiden Polaritäten zu erhalten. Der Nachteil dieser Vektoren ist allerdings, daß beim Einbringen des SP6- Promoters vor den Polylinker das lac Z Gen zerstört wurde und so kein einfaches Screening möglich ist, wie dies für den Vektor pUC8 beschrieben wurde.

Das Plasmid Bluescribe M13+:

Das Plasmid Bluescribe M13+ ist ein Derivat des Plasmids pUC19. Bei diesem sind innerhalb des lac Z Gens auf beiden Seiten des Polylinkers in jeweils entgegengesetzter Orientierung synthetische Promotoren der RNA Polymerasen der E.coli Phagen T3 und T7 insertiert. Das Leseraster des beta-Galacto-

sidase-Gens wird dadurch nicht unterbrochen, so daß der kodierende Teil des Enzymgens exprimiert werden kann und beim Screening wiederum die bereits beschriebene Farbselektion möglich ist. Mit Hilfe der Polymerasen kann eine eingesetzte Fremd-DNA in vitro in RNA transkribiert werden. Dabei können ohne Umklonierung RNAs beider Polaritäten gewonnen werden. Sie werden im weiteren Verlauf zur Unterscheidung von natürlicher Viroid RNA als Transkript- RNAs bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurden auf diese Weise (+) und (-) viroidspezifische Proben für Infektiositätstests und für molekulare Hybridisierungen erzeugt.

Das 3189 Bp große Plasmid Bluescribe M13+ enthält zusätzlich ein 454 Bp langes Fragment des E.coli DNA-Einzelstrang-Phagen M13, die sog. "intergenic" Region. Deren Basensequenz ist bei diesen Phagen in die Verpackung des Einzelstrangs und die Steuerung der Strangselektion involviert. Bei der Einzelstrangisolierung wird der E.coli Stamm JM 101 verwendet. Infiziert man nun Bakterien, die einen solchen Bluescribe-Vektor enthalten, mit M13-Phagen, die eine Verpackungsdefizienz aufweisen, so wird vorwiegend der Einzelstrang des Plasmids verpackt. So kann dank dieses "Helferphagen" die Einzelstrang-DNA (im Falle von Bluescribe M13+ der (+) Strang) des Plasmids isoliert werden. Daher werden diese Plasmide auch als "Phasmide" bezeichnet.

Der auf diese Weise gewonnene DNA Einzelstrang kann mit der Dideoxy-Methode nach Sanger (Sanger et al. 1977) sequenziert werden. Da die Einzelstrang DNA des "Helferphagen" keine spezifische Bindungsstelle für die Sequenzierungsprimer hat, kann sie daher bei der Sequenzierung nicht stören.

3.13. Enzymatische Reaktionen

3.13.1. Abspaltung von 5'-Phosphatgruppen

Die Entfernung von 5'-Phosphatgruppen bei Nukleinsäuren dient vor allem zwei Zielen:

a) Zur Gewinnung von freien 5'-OH-Enden, die für die radioaktive Markierung von DNA durch Übertragung eines endständigen ^{32}P -Phosphatrestes von ATP erforderlich sind.

b) Zur Verhinderung der Zirkularisierung von Plasmiden.

Während einer Ligierung eines DNA-Fragmentes mit einem Plasmid, das mit nur einem Restriktionsenzym linearisiert wurde, kann durch Abspaltung der 5'-Phosphatgruppen verhindert werden, daß dieses Plasmid zirkularisiert wird und so in den nachfolgenden Klonierungsschritten zu einem sehr hohen Anteil an Klonen ohne Insert führen würde.

Vorgehensweise:

Zur Dephosphorylierung wurden pro Picomol an 5'-Enden 0,1 U Kälberdarmphosphatase (CIP) eingesetzt. Ein spezieller Phosphatasepuffer wurde im Anschluß an einen Restriktionsverdau nicht benötigt; das Enzym wurde stets dem Ansatz für 30 Minuten bei 37°C zugegeben. Die Phosphatase wurde durch Zugabe von Nitrilotriessigsäure (NTA) in einer Endkonzentration von 1 mM und anschließende zehnminütige Inkubation bei 60°C inaktiviert.

3.13.2. Endmarkierung von DNA

5'-endmarkierte DNA kann nach der Methode von Maxam-Gilbert (Maxam & Gilbert, 1980) sequenziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl DNA-Primer (zur Sequenzierung bzw. Klonierung der Viroid cDNA) als auch ds DNA-Fragmente (zur Sequenzierung der Klone) mit gamma- ^{32}P -ATP nach folgender Vorschrift markiert:

(1) In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden die zu markierende DNA (mit freien 5'-OH Enden) und gamma- ^{32}P -ATP in einem Molverhältnis von 5:6 gemischt. Für analytische Ansätze wurden 5 Picomol, für Sequenzierungen 20 - 50 Picomol freie 5'-Enden eingesetzt.

(2) Die Probe wurde anschließend lyophilisiert und in 9 μl Kinase-Puffer aufgenommen.

(3) Nach Zugabe von jeweils 1 μ l (9 Units) T4 Polynukleotidkinase wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

(4) Durch Kochen für 1 min wurde die Enzymaktivität zerstört, so daß danach die Probe zur reversen Transkription bzw. zum Restriktionsverdau verwendet werden konnte.

Zusammensetzung des Kinase-Puffers (Endkonzentrationen):

Tris/HCl pH 8.0	50 mM
DTT	5 mM
MgCl ₂	10 mM
BSA	5 μ g/ml

3.13.3. Ligierung von DNA

Die Ligasereaktion dient zur Verknüpfung von linearisiertem Vektor mit dem zu klonierenden DNA-Fragment, wozu T4-induzierte DNA Ligase in einer Endkonzentration von 100 U/ml verwendet wurde.

Die Ligasereaktion wird über Nacht bei 12°C in einem Gesamtvolumen von 20 μ l ausgeführt. Je nach Aufgabenstellung wurden die Konzentrationen von Vektor und Fragment variiert. Der Ligationsansatz konnte anschließend direkt zur Transformation verwendet werden.

Zusammensetzung des Ligasepuffers (Endkonzentrationen):

Tris/HCl pH 7.5	50 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	10 mM
Spermidin	1 mM
ATP	1 mM
BSA	0.1 mg/ml

3.13.4. Reverse Transkription

Das Ausgangsmaterial für diese Arbeit war die CEV-RNA. Um sie der Klonierung und Sequenzierung zugänglich zu machen, mußte sie in ihre DNA-Form "umgeschrieben" werden. Für die Herstellung dieser komplementären DNA (cDNA) wurde die be-

treffende Viroid RNA als Matritze eingesetzt und verschiedene DNA-Oligonukleotide als Primer verwendet, die zu bestimmten Teilen der RNA- Sequenz komplementär sind. Um eine zur Sequenzierung geeignete cDNA zu erhalten, wurde wie folgt vorgegangen:

(1) Ein geeigneter Primer wird in 10 ul Volumen endmarkiert

(2) 2,5 l dieses "Kinase-Ansatzes" und 10 ul einer Viroidprobe in bidest. Wasser werden mit 2.5 ul 0.5 M Tris/HCl pH 8.3 gemischt und 2-2.5 Minuten bei 80°C inkubiert, um die Viroid-RNA aufzuschmelzen und damit einer Bindung des Primers zugänglich zu machen.

(3) Nach dem Abschrecken in flüssiger Luft wird 10 ul eines Puffers mit folgender Zusammensetzung zupipettiert:

Tris/HCl pH 8.3	50 mM
MgCl ₂	6 mM
KCl	120 mM
DTT	25 mM
BSA	10 mg/ml
Actinomycin D	5 mg/ml
dNTPs	je 2 mM
RNasin	500 U/ml

Die Reaktion wird durch Zugabe von 200 U reverser Transkriptase (M-MLV von BRL) gestartet und zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

(4) Die RNA- Matritze wird anschließend durch Zugabe von DNase- freier RNase A zerstört. Die Abtrennung der Mononukleotide von der synthetisierten RNA erfolgte nach dem Prinzip der Permeationschromatographie über eine Biogel A 0,5 m "Minisäule". Dazu wurde eine Pasteurpipette im unteren Bereich mit autoklavierter Glaswolle als Filter versehen, mit Biogel bis knapp zum oberen Rand gefüllt und mit 1x TE-Puffer äquilibriert. Nach Auftragen von 100 ul Transkriptpräparation wurde mit 550 ul TE nachgespült und das Eluat in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Fraktionierung erfolgte in Schritten von 100 ul. Bei ³²P markierten Transkripten wurde die

Cerenkov-Strahlung der Fraktionen mit dem Szintillationszähler gemessen. Die Transkripte befanden sich meist in den Fraktionen 2-5 und wurden anschließend vereinigt. Die abgetrennten Mononukleotide befanden sich in der Regel in der zehnten bis zwölften Fraktion.

Nach präparativen Ansätzen wurde die zweite bis vierte Fraktion vereinigt und die Ausbeute durch Messung der OD₂₆₀ in einer sterilen Küvette bestimmt.

(5) Die Transkripte wurden mit Ethanol präzipitiert (siehe dazu Kapitel 3.21) und im denaturierenden Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt.

Zur Synthese von cDNA für eine nachfolgenden Klonierung wird analog vorgegangen; der verwendete Primer wird jedoch nicht endmarkiert und die Menge an Viroid RNA wird (wie im Ergebnisteil aufgeführt) entsprechend erhöht.

3.13.5. Synthese von ds DNA mit Klenow-Polymerase

Klenow-Polymerase, das große Fragment von DNA Polymerase I aus E.coli, ist in der Lage, Einzelstrang-DNA zum Doppelstrang zu vervollständigen. Es benötigt allerdings zum Start einen kurzen, doppelsträngigen Bereich. Dieser kann durch Zugabe eines Oligonukleotids erzeugt werden. Die Reaktion wurde zur primergesteuerten Klonierung von CEV-RNA angewendet.

Die betreffende DNA wurde dazu in 50 µl des unten aufgeführten Puffers gelöst und mit 10 U Klenow-Enzym für 30 Minuten bei 20°C inkubiert. Die niedrige Temperatur ist deshalb erforderlich, um die Exonukleaseaktivität des Enzyms zu hemmen.

Zusammensetzung des Puffers:

Tris/HCl pH 7.2	50 mM
MgSO ₄	10 mM
DTT	0.1 mM
dNTP	je 0.5 mM
BSA	50 µg/µl

3.13.6. Synthese von ds DNA- nach Gubler und Hoffmann

Im Verlauf der reversen Transkription eines Viroids können auch cDNAs entstehen, die länger sind als das Viroid selbst, wenn dabei das Enzym das zirculäre Viroidmolekül mehr als einmal "umrundet". In diesem Fall kann versucht werden, den zweiten DNA- Strang nach einer Methode zu synthetisieren, die an ein Verfahren angelehnt ist, daß von Gubler und Hoffmann (1983) für die Klonierung von mRNAs entworfenen wurde. Nach Verdau mit einem geeigneten Restriktionsenzym können mittels dieser Methode ds DNA- Fragmente erhalten werden, die das komplette Genom des Viroids enthalten.

Dazu werden die Reaktionsprodukte aus der reversen Transkription nach ihrer Fällung in 100 ul des nachfolgend beschriebenen Puffers gelöst. Nach Zugabe von 0.8 U RNase H, 200 U DNA Polymerase I (E.coli) sowie 10 U DNA Ligase (E.coli) wird für eine Stunde bei 12°C und eine weitere bei 20°C inkubiert. Die Aufarbeitung des Ansatzes erfolgt durch zweimalige Phenolisierung, Extraktion mit CHCl_3 /IAA (24:1, V/V) und Fällung mit 2,5 Vol. Ethanol.

Reaktionspuffer:

Tris/HCl pH 7.5	20 mM
MgCl ₂	5 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 mM
KCl	100 mM
ß-NAD	0.15 mM
BSA	50 ug/ul
dNTPs	je 40 uM

3.13.7. Transkription von DNA mit RNA-Polymerasen

Mit Hilfe spezifischer RNA- Polymerasen und klonierter cDNA als "Template" lassen sich sowohl größere Mengen der entsprechenden RNA in vitro synthetisieren als auch hochspezifische Hybridisierungsproben herstellen (Herold, 1986). Dazu muß sich die DNA in einem Vektor befinden, der auf der einen Seite des Inserts einen Promoter für eine DNA- abhängige RNA Polymerase trägt und auf der anderen Seite eine Erkennungs-

stelle für ein Restriktionsenzym aufweist, mit dem das Plasmid linearisiert werden kann. Bei der anschließenden "runoff" - Transkription erhält man dann ein Produkt definierter Länge, da die Transkription naturgemäß an der Schnittstelle hinter dem Insert abbricht. Die RNA-Transkripte erhalten allerdings an ihren beiden Enden noch Vektorsequenzen, deren Länge durch das verwendete Restriktionsenzym und die Art der Klonierung bestimmt wird.

Auf diese Weise können hochradioaktiv markierte Hybridisierungsproben für analytische Zwecke im Reagenzglas synthetisiert werden. Im präparativen Maßstab läßt sich auf dem gleichen Weg Viroid RNA für Infektiositätstests synthetisieren. Um eine einheitliche RNA-Probe zu erhalten, kann man im Anschluß an die Transkription das DNA Template durch DNase-Zusatz abbauen. Die synthetisierten Transkripte lassen sich dann durch Gelfiltration von den noch in der Probe vorhandenen Mononukleotiden abtrennen.

Für die beschriebenen Transkriptionen standen sowohl das SP6- System als auch das T3/T7- System zur Verfügung.

3.13.7.1. SP6 - System

Die analytische SP6- Transkription wurde in 20 µl Endvolumen in einem Puffer durchgeführt, der folgende Substanzen enthielt:

Tris/HCl pH 7.5	40 mM
MgCl ₂	6 mM
DTT	10 mM
Spermidin	4 mM
ATP, CTP, GTP	je 0.5 mM
UTP	10 µM
alpha ³² P-UTP	10 uCi (410 Ci/mM)
BSA	100ug/ul
RNasin	10 U
Template	1 ug

Nach Zugabe von 20 U SP6-RNA-Polymerase wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die weitere Vorgehensweise ist mit der weitaus häufiger angewandten T3/T7- Transkription identisch und wird dort näher beschrieben.

3.13.7.2. T3- bzw. T7- System

Der verwendete Puffers besaß die gleiche Zusammensetzung wie bei der SP6- Transkription.

Zur Erzeugung einer radioaktiven Hybridisierungsprobe im analytischen Maßstab wird 1 µg linearisierte Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 10 Einheiten T3 bzw. T7 RNA Polymerase 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

Bei der präparativen Transkription wurden 10 µg lineariertes DNA-Template in einem 100 µl Ansatz mit je 500 µM ATP, CTP, GTP und UTP (Endkonzentrationen) versetzt. Nach Zugabe von 100 Einheiten T3 bzw. T7 RNA Polymerase wurde 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Erhöhung der Transkriptionsausbeute wurde anschließend nochmals die gleichen Mengen an Polymerase und an Ribonukleosidtriphosphaten zugegeben, wie sie schon im Puffer enthalten waren, und die Inkubation für weitere 60 Minuten fortgesetzt.

Das weitere Vorgehen war bei den beiden Ansätzen identisch: Nach der Zugabe von 6 U DNase I (RNase frei)/µg Template wurde noch 5 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend phenolisiert. Die mit CHCl_3 /IAA (24/1, V/V) extrahierten Proben wurden dann mit bidest. Wasser auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht.

3.14. Restriktionsanalysen

Die Restriktionsverdaus wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Diese Methode wurde vor allem eingesetzt, um den Erfolg von Klonierungsexperimenten zu überprüfen. Die isolierte DNA wurde dazu oft mit mehreren Enzymen gleichzeitig verdaut und das entstehende Gemisch von Restriktionsfragmenten auf geeigneten Gelsystemen aufgetrennt. Anhand des erhaltenen Bandenmusters konnte so z.B. verfolgt werden, ob ein Insert in den Vektor und in der richtigen Orientierung eingesetzt worden

war. Eine große Hilfe bei der Deutung von Fragmentmustern, die teils sehr viele Banden aufwiesen, war die Möglichkeit, mit Hilfe eines Rechenprogramms eine Zuordnung vorzunehmen. Dieses Programm ist Teil eines größeren Softwarepaketes der University of Wisconsin (UWGCG). Es benötigt zu seinem Ablauf die Vektor- und Insertsequenz sowie die verwendeten Restriktionsenzyme. Als Ausgabe wird dann die theoretisch richtige Reihenfolge und Länge der Fragmente aus einem solchen "Restriktionsverdau" erhalten, die man mit experimentellen Befund vergleichen kann.

3.15. Gelsysteme zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuremoleküle können mit Hilfe der Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt werden (Wobus, 1980). Dies kann man sich im analytischen und im präparativen Maßstab zunutze machen. Große DNA- Fragmente (ab 500 Bp) wurden durch Agarose-Gelelektrophorese, kleinere DNA Fragmente und RNA Moleküle durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt.

3.15.1. Marker

Um die Länge der aufgetragenen Nucleinsäuren zu bestimmen, wurden je nach dem erwarteten Bandenmuster zwei verschiedene Marker verwendet. Sie bestanden jeweils aus Fragmenten des Plasmids pBR322, und wurden durch Behandlung mit häufiger schneidenden Restriktionsenzymen erhalten.

a) Die Spaltung mit Hinf 1 (Erkennungssequenz G'ANTC mit N=A,C,G,T) führte zu insgesamt 10 Fragmenten folgender Länge (in Bp):

75 298	517
154344	1631
220396	
221506	

b) Die Spaltung mit Hae 3 (Erkennungssequenz GG'CC) ergab 22 Fragmente der Länge:

7	89	267
11	104	434
18	123	458
21	124	504
51	184	540
57	192	587
64	213	
80	234	

3.15.2. Nichtdenaturierende Gele

Auf nicht-denaturierenden Gelen wurden doppelsträngige DNA-Fragmente analysiert bzw. präparativ von anderen Bestandteilen abgetrennt. Mit Agarosegelen wurden Fragmente des Größenbereiches zwischen 1000 und 5000 Bp analysiert. Für Nukleinsäuren unter 1000 Bp wurde die stärker auflösende Elektrophorese mit Polyacrylamidgelen verwendet und Sequenzgele wurden eingesetzt, um kleine Fragmente bis hinab zu Mononukleotiden aufzutrennen.

3.15.2.1. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese (Maniatis et al. 1983) diente neben der Auftrennung von langen DNA- Restriktionsfragmenten und der Kontrolle des Erfolges von Plasmidlinearisierungen auch zum sogen. "Screening" von Plasmiden im Rahmen des "Quicktests" (siehe Abschnitt 3.18.1). Je nach Trennproblem wurde die entsprechende Agarosemenge (0.7 - 2.0 g/ 100 ml) in Puffer der Agarose-Gelelektrophorese durch Kochen gelöst und bei ca. 45°C in eine Flachgelform mit den Abmessungen 20x25 bzw. 10x15 cm² gegossen. Die Elektrophorese selbst wurde bei einer Feldstärke von 4 V/cm durchgeführt.

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese:

Na-Acetat	5 mM
EDTA	1 mM

Auftragspuffer A:

Tris/Acetat pH 7.8	40 mM
EDTA	1 mM
Ficoll 400 (Pharmacia)	10 % (G/V)
SDS	0.1 % (G/V)
Bromphenolblau	0.02 % (G/V)

3.15.2.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Mit nicht-denaturierenden, überwiegend 5%igen Phosphatgelen wurden sowohl Fragmentgemische aus Restriktionsverdaus als auch glyoxalierte RNA-Proben aufgetrennt. Für erstere wurden alternativ auch TBE-Gele verwendet.

Phosphatgele:

Die Gellösung mit nachstehendaufgeführter Zusammensetzung wurde entgast und zur Polymerisation mit 0.01 % TEMED versetzt. Anschließend wurde sie in eine Gelform aus Glasplatten der Abmessung 20x25x0.15 cm³ gegossen. Nach ca. einer Stunde Polymerisationszeit war das Gel einsetzbar.

Als Elektrodenpuffer wurde 10 mM Natriumphosphat pH 6.5 verwendet. Um pH-Schwankungen zu verhindern, wurden die Elektrophorese-Apparaturen mit Salzbrücken ausgestattet. Die Stromstärke wurde auf 40 mA limitiert; dabei stellte sich eine Spannung von ca. 270 V ein.

Gellösung:

Natriumphosphat pH 6.5	10 mM
Acrylamid/Bisacrylamid 39:1	5 %
APS	0.1 %

Auftragspuffer P:

(G/V) Ficoll	10 %
EDTA	1 mM
Natriumphosphat pH 6,5	10 mM
SDS	0.1 % (G/V)
Bromphenolblau	0.05 % (G/V)
Xylencyanol	0.05 % (G/V)

TBE- Gele

Das TBE-Gelsystem hatte den Vorteil, daß aufgrund der höheren Spannung von ca. 500-700 V (bei 40 mA Stromstärke) deutlich kürzere Laufzeiten erreicht wurden als im Fall von Phosphatgelen. Außerdem war wegen des höheren Salzgehaltes keine Strombrücke erforderlich.

1 M TBE-Lösung:

Tris/HCl pH 8.3	1 M
Borsäure	830 mM
EDTA	10 mM

Gellösung:

Acrylamid/Bisacrylamid 39:1	5 %
APS	0.1 %
TBE	50 mM

Auftragspuffer S:

Formamid	95 % (V/V)
TBE	0.25 mM
EDTA	1 mM
Bromphenolblau	0,1 % (G/V)
Xylencyanol	0,1 % (G/V)

3.15.3. Denaturierende Gele

Einzelsträngige Proben wie Viroid RNA, DNA-Primer oder die Produkte von reversen Transkriptionen wurden auf denaturierenden TBE- Gelen analysiert, die zu diesem Zweck Harnstoff enthielten. Zur Reinigung der Primer wurden 20 %ige Harnstoff-TBE-Gele der Abmessungen 40x20x0.3 cm³ benutzt.

Die zur Auftrennung von Nukleinsäureextrakten aus Pflanzen verwendeten vertikalen TBE- Gele waren 1,5 mm dick und besaßen eine Fläche von 20 x 25 cm. Bei hohem Polysaccharidgehalt der Probe wurde ein gesondertes Sammelgel auf das Trenngel gegossen.

Zusammensetzung der Gellösungen:

	Trenngel	Sammelgel
Harnstoff (Biorad)	8 M	8 M
TBE	100 mM	50 mM
Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)		5 %
Acrylamid/Bisacrylamid (4:1)		3 %
APS (Biorad)	1 %	1 %
TEMED (Biorad)	0.05 %	0.05 %

Die Gellösung wurde jeweils vor Zugabe der Polymerisierungsinitiatoren filtriert und zur Entgasung mit einem Ultraschallgerät (Branson 12) beschallt. Die aufzutragenden Nukleinsäuren wurden in bidest. Wasser gelöst (maximal 20 µl/Geltasche), mit dem gleichen Volumen Auftragspuffer S versetzt und zur Denaturierung 5 Minuten bei 60°C inkubiert. Die elektrophoretische Trennung wurde im Wärmeschrank bei 40°C über Nacht durchgeführt, wobei die Stromstärke bei 10 mA konstant gehalten wurde.

Sequenzgele

Mit sehr dünnen Polyacrylamidgelen können Nukleinsäuren aufgetrennt werden, die sich nur um ein einziges Nukleotid voneinander unterscheiden (Sanger & Coulson 1978). Zur Herstellung der Sequenzgele werden zwei Glasplatten der Abmessungen 20x60 cm benötigt. Da die Platte mit den Aussparungen zur Gelkammer hin nach dem Ende des Laufes abgelöst werden soll, wird sie daher zur Erzeugung einer hydrophoben Oberfläche auf der Innenseite mit Dichlordimethylsilan behandelt. Auf der anderen Platte soll das Gel haften bleiben, damit es später ohne Verwerfungen getrocknet werden kann; deshalb wird die Glasoberfläche hier mit gamma-Methyloxypropyltrimethylsilan (Wacker-Chemie) beschichtet. Durch dessen endständige Doppelbindung wird bei der Polymerisation das entstehende Gel kovalent an die Glasplatte gebunden. Auf diese Weise kann das Gel auf der Platte getrocknet und anschließend zur Autoradiographie benutzt werden.

Da die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes ist, wird der Abstand zwischen den einzelnen Banden zum unteren Ende des Gels immer größer. Diesem Effekt kann dadurch entgegengewirkt werden, indem die Glasplatten durch keilförmige "Spacer" der Dicke 0.2-0.6 mm auseinandergehalten werden. So entsteht im Gel ein elektrischer Feldgradient, der von der Auftragsseite (dünner Teil) nach unten (dickerer Teil des Gels) abnimmt. Auf diesen "Gradienten-Gelen" wird die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente um so geringer, je näher sich diese am unteren Ende des Gels befinden. Der Abstand zwischen den DNA-Banden, die sich nur um ein Nukleotid unterscheiden, wird dadurch über das ganze Gel hin etwas gleichmäßiger, so daß auf diesen Gelen bis zu 350 Nukleotidpositionen aufgelöst werden können. Ein Nebeneffekt dieser Methode ist eine durch den Feldgradienten verursachte Verringerung der Bandenbreite, was ebenfalls zu einer besseren Lesbarkeit der Bandenmuster führt.

Die Gellösung entspricht derjenigen eines denaturierenden TBE-Geles (siehe oben) mit 100 mM TBE. Die Acrylamidkonzentration betrug je nach Sequenzierungsproblem 5-10 %. Nach dem Lösen des Harnstoffs wurde durch ein Faltenfilter (Schleicher&Schuell) filtriert und die Polymerisation durch 0.05 % TEMED initiiert.

Die Gellösung wurde auf die waagerecht liegende Glasplatte gegossen, über die vorsichtig eine zweite Platte mit den Aussparungen für den Kamm geschoben wurde, der zur Ausbildung der 20 Taschen dient. Nach ca. 1 Stunde Polymerisationszeit konnten die Gele verwendet werden.

Als Elektrodenpuffer wurde 100 mM TBE verwendet. Die Auftragslösung bestand aus 95 % Formamid, das zuvor deionisiert wurde, 1 mM EDTA sowie je 0,1 % der Farbstoffe Xylenolblau und Bromphenolblau.

Um die Gele möglichst stark zu erwärmen, wurde eine begrenzende Leistung von 60 Watt gewählt, bei der die Oberflächentemperatur der Gele im sich am stärksten erwärmenden oberen Bereich bei ca. 90°C lag. Es stellten sich dann je nach

Gelstärke eine Stromstärke von ca. 25 mA und eine Spannung von 2000 - 3000 V ein.

Um die entstehende Wärme auf einfache Weise möglichst gleichmäßig zu verteilen, wurde eine der beiden Glasplatten mit einer 3 mm dicken Aluminiumplatte belegt. Dadurch konnte eine ungleiche Laufgeschwindigkeit der Proben, das sogen. "Smiling", aufgrund unterschiedlichen Wärmeabflusses weitgehend verhindert werden.

Nach Abschluß der Elektrophorese wurde die Platte mit den Aussparungen abgehoben und die Glasplatten, auf denen nun die Gele hafteten, für ca. 30 Minuten in 10%iger Essigsäure inkubiert. Anschließend wurden sie unter fließendem Wasser weitere 5 Minuten zur Entfernung des restlichen Harnstoffs abgespült und für 2 Stunden bei 80°C im Wärmeschrank getrocknet. Schließlich wurden die als dünne Filme auf der Glasplatte erhaltenen Gele je nach Intensität der Strahlung autoradiographiert.

3.15.4. Bidirektionale Gele

Diese Art von Gelelektrophorese eignet sich besonders für präparative Trennungen von Nukleinsäureextrakten aus Pflanzen. Dazu werden die entsprechend vorfraktionierten Nukleinsäuren (siehe Kapitel 3.16.2) in ca. 500 μ l bidest. Wasser gelöst und zur Beschwerung mit 10 % Glycerin versetzt.

Zur Vortrennung werden die Nukleinsäuren auf einem nativen TBE-Gel (100 mM TBE) der Größe nach aufgetrennt. Die Laufzeit beträgt bei 20°C und 45 mA Stromstärke ca. 2½ h. Viroid RNA läuft bei einer Gelstärke von 5 % Acrylamid und einem Quervernetzungsgrad von 5 % auf Höhe des Farbstoffes Xylencyanol. Dieser Gelstreifen wird in einer Breite von ca. 1 cm ausgeschnitten und in ein zweites Gel einpolymerisiert, welches zusätzlich 8 M Harnstoff enthält.

In der nun folgenden zweiten Geltrennung werden die Nukleinsäuren aus dem ausgeschnittenen Gelstreifen unter denaturierenden Bedingungen (T=50°C) separiert. Die Viroid RNA weist dabei aufgrund ihrer Zirkularität eine sehr geringe

Mobilität auf und läuft am langsamsten. Auf diese Weise gelingt eine Abtrennung des zirkulären Viroids sowohl seiner linearen Form als auch von der 7S- RNA. Wegen der dabei entgegengesetzten Laufrichtungen beider Elektrophoreseschritte wird dieses Verfahren auch als bidirektionale Gelelektrophorese bezeichnet. Die Bande, die das zirkuläre Viroid enthält, wird ausgeschnitten und zur Elution einer Isotachophorese unterworfen.

3.16. Präparative Separation von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung von Nukleinsäuregemischen in größerem Maßstab und zur Wiedergewinnung bestimmter Einzelkomponenten haben sich Trennmethoden als geeignet erwiesen, bei denen die Gemische unter Druck über eine Säule in relativ kurzer Zeit separiert werden konnten.

3.16.1. FPLC-Trennung

Um aus einem Plasmid das Insert in größeren Mengen wiederzugewinnen, muß es mit geeigneten Restriktionsenzymen ausgeschnitten und anschließend vom Plasmidrest abgetrennt werden. Dazu wurde eine Chromatographieart herangezogen, die zwar ursprünglich zur Trennung von Proteinen entwickelt wurde, aber für diese Aufgabe sowohl von der Kapazität als auch von der Trennqualität her in Frage kam. Verwendet wurde eine Säule der Abmessungen 60 x 0.9 cm, die mit TSK HW 75 bzw TSK HW 65 gefüllt war.

Laufpuffer:

0.3 M NaOAc pH 9

1X Natriumkakyolat

Nach dem Auftrag der Probe (100- 500 µg DNA) auf die mit Kakyolatpuffer äquilibrierte Säule wurden die gebundenen Nukleinsäuren mit einem linearen Salzgradienten (0 - 0.3 M NaOAc pH 9) innerhalb von 30 Minuten fraktioniert. Anschließend wurde das Eluat auf einem 2,5 %igen Agarosegel analysiert und in den entsprechenden Fraktionen die Nukleinsäuren mit Ethanol gefällt. Nach der Zentrifugation wurde das Sediment nachgewaschen, in der Speed-vac getrocknet und in TE- Puffer gelöst.

3.16.2. HPLC-Trennung

Diese Verfahren wurde verwendet, um aus Pflanzenmaterial in präparativem Maßstab ausreichende Mengen an Viroid zu isolieren. Dazu mußten die Nukleinsäureextrakte in entsprechender Weise so weit aufgearbeitet werden, bis sie in einer für diese Trennmethode geeigneten Reinheit vorlagen. Die hierzu erforderlichen Schritte sind im folgenden kurz dargestellt.

RNA-Extraktion:

5 - 10 g Blattmaterial aus viroidinfizierten bzw. gesunden Pflanzen wurden in einem 50 ml Falconröhrchen mit 15 ml Extraktionsphenol, 15 ml TES-Puffer, 200 µl 5 % (G/V) Bentonit-Suspension und 100 µl 25 % (G/V) SDS versetzt und mit dem Ultra Turrax für mindestens 45 Sekunden homogenisiert.

Nach dreißigminütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur in der Minifuge (5500 UPM) wird der nukleinsäurehaltige, wässrige Überstand vorsichtig abgehoben und die Phenolphase zusammen mit der mächtigen Interphase, in der sich die Blattrümmer befinden, noch einmal mit 10 ml TES- Puffer extrahiert und zentrifugiert. Die vereinigten wässrigen Überstände werden zweimal mit je 25 ml Extraktionsphenol unter kräftigem Schütteln 10 min extrahiert

Anschließend wird der wässrige Überstand mit 25 ml CHCl_3 /IAA (24/1, V/V) gewaschen. Die im Überstand enthaltenen Nukleinsäuren werden mit Ethanol gefällt.

Abtrennung von Polysacchariden:

Hierzu wird das Pellet in 2 ml bidest. Wasser aufgenommen und mit dem 2.1- fachen Volumen einer 30%igen (w/w) Kaliumphosphatlösung pH 7.6 sowie dem 1.1- fachen Teil einer 30%igen (w/w) Lösung von PEG 6000 versetzt. Nach ca 5 Minuten Mischen auf dem Vortex-Mixer erfolgt die Phasentrennung durch Zentrifugation (ca. 5500 rpm, 5 min, 4°C). Die untere Phase enthält dann neben 18 % Kaliumphosphat und 2 % PEG die Nukleinsäuren. Diese werden mittels der folgenden Fällung mit CTAB vom Phosphat und PEG, welches bei einer Ethanol-fällung mit im Pellet enthalten wäre, isoliert.

Für die Fällung wird die Nukleinsäurephase zu Erniedrigung der spezifischen Dichte mit dem gleichen Volumen bidest. Wasser verdünnt, dann mit dem 0.1-fachen Volumen einer 10%igen CTAB- Lösung versetzt und über Nacht im Kühlschrank belassen. Der dabei entstehende nukleinsäurehaltige Niederschlag wird anschließend abzentrifugiert.

LiCl-Fraktionierung der gefällten Nukleinsäuren:

Ribosomale RNA ist in einer Lösung von 2 M LiCl unlöslich. Daher läßt sich durch Fraktionierung mit einer solchen Salzlösung die ribosomale RNA von der in 2 M LiCl löslichen zellulären DNA sowie den ebenfalls löslichen "kleinen" RNAs wie z. B. der tRNA, 5S RNA, 7S RNA und Viroid RNA abtrennen.

Dazu wird das durch CTAB-Fällung gewonnene Nukleinsäuresediment ca. 1 Stunde mit dem Paramix in 1 ml 2 M LiCl bei 4°C geschüttelt. Nach der daran anschließenden fünfzehnminütigen Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge wird der Überstand abgenommen und die LiCl-Fraktionierung noch zweimal wiederholt. Die in den vereinigten Überständen enthaltenen die sog. "LiCl-lösliche Nukleinsäuren" wurden durch Ethanol-fällung gewonnen.

DNA- Verdau:

Der DNA- Verdau dient dazu, die RNA von der zellulären DNA zu befreien. Dazu wird das Sediment in DNase- Puffer gelöst und mit 50 - 100 Einheiten DNase I bei 25°C für 1 Stunde behandelt. Das Enzym wird anschließend durch Phenolisierung und erneute Ethanol-fällung der Nukleinsäuren entfernt.

Die so aufgereinigte Probe wird zur Entfernung der störenden Salze über eine präparative Biogelsäule fraktioniert und abermals mit Ethanol gefällt.

HPLC- Fraktionierung:

Zur HPLC- Fraktionierung werden die Nukleinsäuren in 400-1000 ul Puffer A gelöst und auf eine Nucleogen DEAE 500 Säule aufgetragen. Die Elution erfolgt durch einen linearen Salz-

gradienten von 0 - 60 % Puffer B. Aliquots der einzelnen Fraktionen wurden mittels Dot blot und molekularer Hybridisierung (siehe Kapitel 3.24) auf ihren Viroidgehalt untersucht. Die viroidhaltigen Fraktionen wurden zusammengegeben und die darin enthaltenen Nukleinsäuren mit Ethanol gefällt. In dem Sediment befinden sich allerdings auch die Phosphate, die jedoch durch eine Fraktionierung über eine Biogelsäule abgetrennt werden können.

Zusammensetzung der Lösungen:

TES-Puffer:

Tris/HCl pH 7.5	100 mM
EDTA	10 mM
NaCl	100 mM

DNase- Puffer

Tris/HCl pH 7.5	40 mM
MgCl ₂	6 mM

Puffer A:

Natriumphosphat pH 6.5	30 mM
EDTA	0.1 mM
Formamid	50 % (V/V)

Puffer B:

wie Puffer A, jedoch zusätzlich 1.25 M NaCl

3.17. E.coli Kulturen

Bei den verwendeten E.coli Stämme handelt es sich ausschließlich um Derivate von E.coli K12.

3.17.1. Selektion

Die Bakterienstämme JM101 und JM109 enthalten ein F'-Plasmid, auf dem unter anderem das für die bereits früher beschriebene Komplementation erforderliche Gen der beta-Galaktosidaseuntereinheit sowie Gene der Prolinsynthese lokalisiert sind. Daher sind Klone aus Bakterienzellen ohne dieses F'-Plasmid auf X-Gal- und IPTG- haltigen Agarplatten, farblos. Alle Klone, die Fremd-DNA tragen, sind ebenfalls farblos. Wei-

terhin sind nur F'-Plasmid- haltige Zellen in der Lage, auf prolinfreiem Minimalmedium zu wachsen. Daher können die E.coli Stämme JM101 und JM109 vor ihrer Verwendung zur Transformation selektioniert werden. Dazu wurde eine Bakteriensuspension auf einer Agarplatte, die nur Minimalmedium und Thiamin (1 mM) enthielt, ausgestrichen und ca. 2 Tage bis zur Ausbildung von stecknadelgroßen Kolonien im Brutschrank bei 37°C belassen. Ausgehend von diesen Kolonien wurden Bakterien zur anschließenden Transformation angezogen.

3.17.2. Dauerkulturen

Dauerkulturen dienen dazu, Bakterien über längere Zeiträume hinweg lebensfähig zu erhalten. Es wurden zwei Arten von Dauerkulturen verschiedener E.coli Stämme hergestellt (Maniatis et al. 1982): TM-Kulturen, die zur Aufbewahrung für maximal 2 Monate dienen, sowie DMSO-Kulturen, aus denen die Zellen über Jahre hinweg regeneriert werden können.

TM-Kultur:

Die Bakterien wurden über Nacht in YT-Medium hochgezogen. 1 ml der Zellsuspension wurde abzentrifugiert, einmal mit TM-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in TM-Puffer aufgenommen und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

DMSO-Kultur:

Zu einer oben beschriebenen, frisch hergestellten TM-Kultur wird Dimethylsulfoxid bis zu einer Konzentration von 8 % (V/V) zugesetzt. Danach wurde die Zellsuspension bei -80°C eingefroren.

Zusammensetzung des TM Puffers:

Tris/HCl pH 8.0	10 mM
MgCl ₂	10 mM

3.17.3. Hauptkulturen

Zur präparativen Gewinnung von Plasmid- DNA wurden größere Bakterienkulturen angelegt. Dies wurde entweder in Schüttelkolben mit Volumina bis 3000 ml oder in einer 10 l enthaltenden Flasche durchgeführt. Dazu wurde das Vollmedium direkt in dem zur Anzucht verwendeten Gefäß angesetzt und autoklaviert. Nach dem Temperieren auf 37°C wurde das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Anschließend wurde mit einer Übernachtskultur des betreffenden Bakterienstammes in 0.1 % des Medienvolumens angeimpft und über Nacht entweder durch Schütteln oder im Fall von 10 l- Flaschen über einen Blasenstein belüftet. Eine üblicherweise durch Chloramphenicol erreichbare Amplifikation der Plasmidkonzentration ist bei den verwendeten Plasmiden nicht erforderlich, da es sich durchweg um Plasmide mit einer Kopienzahl von 200-300 pro Zelle handelte. Die bis zur stationären Phase gewachsenen Kulturen wurden dann wie nachfolgend beschrieben aufgearbeitet. Bei Verwendung der 10 l Kulturflasche wurden Ausbeuten von 0.5 bis 1.5 mg/l erzielt, während bei Kulturen in der Größenordnung von 100-200 ml Ausbeuten von 5 bis 20 mg/l erreicht wurden. Daher wurde im Lauf der Arbeit später überwiegend die letztgenannte Methode angewendet.

3.17.4. Vorbereitungen zur Transformation

Die Fähigkeit von Bakterienzellen, fremde DNA aufzunehmen, hängt von der Durchlässigkeit der Zellmembran ab. Werden die Zellen mit zweiwertigen Kationen vorbehandelt, so steigt die Durchlässigkeit der Zellmembran stark an. Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Verfahren machen sich diese Tatsache zunutze: Bei der CaCl_2 -Methode (Dagert & Ehrlich 1979) bewirken Ca^{2+} -Ionen eine erhöhte Durchlässigkeit, bei der 100 mal effizienteren Methode nach Hanahan (1983) wird dies durch das Zusammenspiel verschiedene Ionen erreicht. Als Transformation bezeichnet man den eigentlichen Prozeß der Aufnahme von fremder Nukleinsäure in die Zelle.

3.17.4.1. CaCl_2 - Methode

(1) Es wurden 50 ml TMC-Medium mit dem gewünschten E.coli Stamm angeimpft.

(2) Nach Hochziehen bei 37°C unter Schütteln bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0.2$ wurden die Zellen 15 Minuten auf Eis gekühlt.

(3) Die Zellsuspension wurde 5 Minuten mit der Minifuge abzentrifugiert und das Sediment in 25 ml 50 mM CaCl_2 aufgenommen.

(4) Nach halbstündiger Inkubation auf Eis wurde erneut mit der Minifuge abzentrifugiert; der Niederschlag wurde nun in 2.5 ml 50 mM CaCl_2 resuspendiert.

(5) Die Suspension wurde mindestens 1 Stunde auf Eis belassen. Anschließend wurden die kompetenten Zellen in 100 ul Aliquots portioniert.

(6) Zu je 100 ul Zellen wurden maximal 10 ul von zuvor durchgeführten Ligase-Reaktionsansätzen (siehe Kapitel 3.13.3) gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert.

(7) Nach zweiminütiger "Hitzeschock", d.h. Inkubation bei 42°C im Wasserbad wurden die Proben mit je 800 ul TMC-Medium versetzt und 60 Minuten bei 37°C geschüttelt.

(8) Anschließend wurde auf entsprechenden Agarplatten ausplattiert.

Zusammensetzung des TMC-Mediums (pro 1 l):

Caseinhydrolysat	10 g
Hefeextrakt	1 g
Glucose	1 g
NaCl	8 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0.3 g
autoklaviert	

3.17.4.2. Hanahan- Methode

(1) Der zu transformierende Bakterienstamm wird in 5 ml SOB-Medium über Nacht hochgezogen.

(2) Anschließend wird ein 300 ml Kolben, der 30 ml SOB-Medium enthielt, mit der Übernachtskultur angeimpft. Unter Schütteln wird der Bakterienstamm bis zu einer Zelldichte von ca. 5×10^7 bei 37°C inkubiert. Das entspricht bei E. coli JM 109 einer OD₅₅₀ von 0.8 - 0.9.

(3) Anschließend wurden je 10 ml Zellsuspension in 50 ml Falconröhrchen überführt und 15 Minuten auf Eis inkubiert.

(4) Die Bakterienzellen wurden mit der Christ Minifuge 15 Minuten bei 2500 Upm und 40°C abzentrifugiert und mit je 3.3 ml TFB pro Falconröhrchen resuspendiert.

(5) Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das Zellsediment jeweils in 0.8 ml TFB aufgenommen und unter vorsichtigem Drehen mit 28 ul DMSO versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden 28 ul der DTT-Stammlösung unter vorsichtigem Drehen hinzugegeben. Der Ansatz wurde dann für weitere 10 Minuten gekühlt und schließlich nochmals mit 28 ul DMSO versetzt.

(6) Nach weiteren fünf Minuten auf Eis wurde der Ansatz mit einer Glaspipette in 210 ul Portionen auf 15 ml Falconröhrchen verteilt. Dann wurde die zu transformierende DNA-Lösung in einem möglichst geringes Volumen (meist weniger als 10 ul) hinzupipettiert.

(7) Nach halbstündiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen für genau 90 Sekunden in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt und damit einem "Hitzeschock" ausgesetzt. Anschließend wurden die Proben in einem Eisbad wieder abgekühlt.

(8) Jeder Transformationsansatz wurde nun mit 800 ul SOC-Medium versetzt und bei 37°C unter mildem Schütteln eine Stunde inkubiert.

(9) Als letzter Schritt erfolgte die Ausplattierung der Transformationsansätze auf X-Gal/Amp Platten.

Zusammensetzung der Lösungen und Medien:

2 M Mg^{2+} Stammlösung:

$MgCl_2$ 1 M

$MgSO_4$ 1 M

2 M Glucose Stammlösung:

sterilfiltriert, bei 4°C gelagert.

1 M KMES pH 6,3:

1 M Morpholinoethansulfonsäure (Serva)
mit KOH auf pH 6.3 eingestellt,
sterilfiltriert und portionsweise eingefroren;
Lagerung bei -20°C.

1 M KOAc pH 7,0:

1 M Kaliumacetat mit Essigsäure auf pH 7.0 eingestellt,
sterilfiltriert und portionsweise eingefroren;
Lagerung bei -20°C

DMSO (Fluka):

550 µl Portionen eingefroren bei - 20°C;
nur einmal verwenden.

DTT-Stammlösung:

DTT 2.25 M

KOAc pH 7.0 40 mM

sterilfiltriert und portionsweise bei - 20°C eingefroren.
Jede Lösung wurde nur einmal benutzt.

SOB Medium:

Trypton 2% (G/V)

Hefeextrakt 0.5 % (G/V)

NaCl 10 mM

KCl 2.5 mM

autoklaviert, dann Zugabe von sterilen

$MgCl_2$ 10 mM

$MgSO_4$ 10 mM

SOC Medium:

wie SOB Medium, jedoch zusätzlich mit 20 mM Glucose.

TFB (Transformationspuffer):

KMES pH 6.2	10 mM
RbCl (Fluka)	100 mM
MnCl ₂	45 mM
CaCl ₂	10 mM
(Co(NH ₃) ₆)Cl ₃	3 mM

Die Salze wurden abgewogen , in 10 mM KMES gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt

X-Gal/Amp-Platten: (Angaben in G/V)

Caseinhydrolysat	1 %
Hefeextrakt	1 %
NaCl	0.5 %
Agar	1.5 %
autoklaviert und auf 60°C abgekühlt	
X-Gal gelöst in DMF	0.003 %
IPTG	0.0012 %
Ampicillin	0.01 %

3.18. Plamidisolierung

Zur Analyse von Plasmiden, die zur Klonierung eingesetzt bzw. dabei verändert wurden, und zur präparativen Wiedergewinnung wurden verschiedene Techniken der Plasmidisolierung angewendet.

3.18.1. Schnelltest

Der Schnelltest soll auf möglichst einfache und zeitsparende Weise zeigen, ob der verwendete Plasmid-Vektor die zu insertierende Fremd-DNA auch wirklich enthält. Dazu wird das jeweilige Plasmid ungespalten zusammen mit dem Ausgangs-Vektor als Längenmarker einer Agarose-Gelelektrophorese unterworfen. Plasmide, die entsprechend größer als der Ausgangs-Vektor waren, wurden dann weiter analysiert.

Methodik des Schnelltests:

(1) Von den über Nacht bei 37°C inkubierten Kulturplatten wurden farblose und daher vermutlich fremde DNA enthaltende Kolonien auf jeweils 5 ml YT-Medium (Ampicillinkonzentration 10 µg/ml) überimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

(2) 0.5 ml dieser Zellsuspension wurden mit der Eppendorff-zentrifuge abzentrifugiert und das Sediment mit 130 µl Cracking-Puffer versetzt.

(3) Die Eppendorff-Reaktionsgefäße wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur intensiv geschüttelt und anschließend 15 Minuten zentrifugiert.

(4) 30 µl des Überstandes wurden auf ein 0.7-1 %iges Agarosegel aufgetragen. Auf diese Weise lassen sich pro Gel viele Plasmide gleichzeitig auf ihren Insertgehalt hin analysieren.

Zusammensetzung des "Cracking"- Puffers:

Tris/HCl pH 6.8	50 mM
SDS	1 % (G/V)
EDTA	2 mM
Sucrose	0.4 M
Bromphenolblau	0,01 % (G/V)

3.18.2. Analytische und präparative Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung nach der Vorschrift der Firma BRL (Bethesda Research Laboratories, 1983) verläuft nahezu analog der Methode nach Birnboim und Doly (1979). Jedoch wird auf eine Phenolextraktion ganz verzichtet und die rRNA durch Ammoniumacetatfällung vor dem RNA- Verdau abgetrennt. Sie ist sowohl für analytische als auch für präparative Plasmidisolationen geeignet. Für einen präparativen Ansatz wurden leicht veränderte Mengen an Lösungen eingesetzt. Die Werte hierfür sind bei den einzelnen Reaktionsschritten in Klammern angegeben und kursiv gedruckt. Bei den analytischen Ansätzen wurde in 2.2 ml Eppendorffgefäßen gearbeitet, während beim präparativen Ansatz 50 ml Falcon- Röhrchen eingesetzt wurden.

Lösungen:

Lyse-Puffer:

Tris/HCl pH 8.0	25 mM
EDTA	50 mM
Glucose	1 % (G/V)

SDS Lösung:

NaOH	200 mM
SDS	1 % (G/V)

(immer frisch zubereitet)

3 M Kaliumacetat pH 4.8

7.5 M Ammoniumacetat

Durchführung:

(1) 5 ml (100 ml) YT Medium mit 100 ug/ml Ampicillin wurden mit dem entsprechenden Klon angeimpft und bis zur stationären Phase angezogen.

(2) Die Zellen aus 4 ml (100 ml) Zellsuspension wurden mit 1 ml (20 ml) TM Puffer gewaschen und 2 Minuten zentrifugiert.

(3) Sofort nach dem Resuspendieren in 150 ul (2 ml) Lyse-Puffer erfolgte die Zugabe von 300 ul (4 ml) frisch zubereiteter SDS Lösung.

(4) Nach vorsichtigem Schütteln wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert.

(5) 225 ul (3 ml) kaltes 3 M KAc pH 4.8 wurden hinzupipettiert, leicht geschüttelt und 5 Minuten bei 4°C inkubiert. Hierbei renaturiert nur das Plasmid vollständig zum Doppelstrang, während sich die chromosomale DNA während der Renaturierung infolge ihrer Länge stark verknäult und dabei unlöslich wird.

(6) Zur Entfernung der unlöslichen Bestandteile wurde das Reaktionsgefäß 30 Minuten lang zentrifugiert.

(7) Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die Nukleinsäuren durch Zugabe von 2 Volumen Ethanol gefällt.

(8) Nach einer zwanzigminütigen Inkubation auf Eis konnten die gefällten Nukleinsäuren abzentrifugiert werden.

(9) Das lyophilisierte Sediment wurde in 200 μ l (2 ml) TE Puffer gelöst. Durch die Zugabe von 100 μ l (1 ml) eiskaltem 7.5 M Ammoniumacetat kann ein Großteil der hochmolekularen RNA ausgefällt und durch anschließende Zentrifugation entfernt werden.

(10) Hierzu wurde zur Vervollständigung der Fällung bei 4°C für 20 Minuten inkubiert und anschließend bei 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert .

(11) Zum Überstand wurden 2 Volumina Ethanol gegeben, gut ge-mischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert.

(12) Nach der Zentrifugation wurde das Sediment mit 70 % (V/V) Ethanol gewaschen und getrocknet.

(13) Das Lyophilisat wurde in 11 μ l TE Puffer gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

(14) Im Fall der präparativen Plasmidisolierung wurde das Lyophilisat in 500 μ l TE Puffer gelöst und von 20 μ l die OD₆₀₀ bestimmt.

3.18.3. Plasmidisolierung über Sephacryl S1000

Um Plasmide im präparativen Maßstab, d.h. in Milligramm-Mengen zu isolieren, wurden die Plasmide aufgereinigt und durch Gelfiltration von den übrigen zellulären Nukleinsäure-Komponenten abgetrennt (Tabler 1983). Dazu wurde zunächst ein schonender Zellaufschluß verwendet (Friedrich 1980), der bewirkte, daß die E.coli Wirts-DNA mit der Zellmembran verbunden blieb und daher durch eine Ultrazentrifugation von den Zellfragmenten abgetrennt werden konnte. Dabei wurde in Kauf genommen, daß die in den Zellen enthaltenen Plasmide nicht quantitativ freigesetzt wurden, so daß man im Vergleich zu anderen Verfahren etwas geringere Ausbeuten, nämlich 0,2 - 1 mg an-

stelle von 2 - 5 mg pro Liter Kulturansatz erhielt. Vorteilhaft an diesem Verfahren ist die größere Schnelligkeit und der geringere Arbeits- und Kostenaufwand.

Methodik der präparativen Plasmidisolierung:

(1) 1 Liter YT Medium mit einer Ampicillinkonzentration von 10 ug/ml wurde mit einer frischen Vorkultur des entsprechenden E. coli Stammes angeimpft. Die Zellen wurden bei 37°C und bei kräftiger Belüftung 16 - 20 Stunden lang hochgezogen.

(2) Die Zellen wurden in der Christ Cryofuge bei 4°C mit 4000 Upm für 30 Minuten sedimentiert.

(3) Das Zellsediment wurde für mindestens 30 Minuten bei -20°C eingefroren.

(4) Die Zellen wurden in soviel 50 mM Tris-HCl pH 8.0/20 % (G/V) Saccharose resuspendiert, daß ein Gesamtvolumen von 19 ml erreicht wurde.

(5) Die Zellsuspension wurde nun in ein für den Beckman Rotor 50.2 Ti passendes, eisgekühltes Zentrifugenröhrchen überführt.

(6) Es wurden 5 mg Lysozym aus Hühnereiweiß zugemischt, um die Zellwände der Bakterien partiell aufzulösen. Die Mischung wurde für 10 Minuten auf Eis belassen.

(7) Nach Zugabe von 2 ml 0.25 M EDTA pH 8.0 wurde das Zentrifugenröhrchen zweimal invertiert und weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert.

(8) Nun erfolgte die Zugabe von 2 ml 5 M NaCl und abermaliges zweifaches Invertieren. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen auf Zimmertemperatur erwärmt.

(9) Zum Zellaufschluß wurden mit einer geeichten Pasteurpipette 0.8 ml einer 25 %igen (G/V) SDS-Lösung in der Zellsuspension verteilt, gefolgt von einem Pipettenvolumen Luft. Anschließend wurde 5 Minuten gewartet.

(10) Die Abtrennung der durch diese schonende Behandlung entstandenen Zelltrümmer erfolgte mit Hilfe der Beckman Ultrazentrifuge im Rotor 50.2 Ti (Beckman) bei 35000 Upm und 10°C für 45 Minuten.

(11) Der Überstand, der die Plasmide enthielt, wurde vorsichtig abgegossen und in ein 50 ml Falconröhrchen überführt.

(12) Zur Abtrennung der Proteine und zur weiteren Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte eine zweimalige Extraktion der wässrigen Phase mit je 15 ml Extraktionsphenol.

(13) Der Plasmid-haltige wässrige Überstand wurde mit einem gleichgroßen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24/1, V/V) von Phenolresten befreit und anschließend in einem 250 ml Zentrifugenbecher mit Ethanol gefällt und lyophilisiert.

(14) Das Lyophilisat wurde in 1 - 2 ml TE-Puffer gelöst, mit 5 μ l PNase (10 μ g/ μ l) versetzt und zum Abbau der RNA bei Raumtemperatur ca. 2 Stunden inkubiert.

Die so gewonnene Nukleinsäure-Proben enthielten das Plasmid in verschiedenen Formen und Bruchstücke niedermolekularer RNAs, aber keinerlei chromosomale E.coli DNA.

Durch Gelfiltration der Plasmid DNA mittels einer Sephacryl S 1000 Säule wurden die niedermolekularen Nukleinsäure-Bruchstück abgetrennt. Verwendet wurde eine Säule mit einem Querschnitt von 5 cm² und einer Länge von 90 cm. Die Trennungen wurden bei Raumtemperatur mit einem Durchflußvolumen von ca. 40 ml/Stunde mit dem unten aufgeführten Säulenpuffer durchgeführt, der vor dem Gebrauch gründlich entgast wurde. Die relativ hohe Ionenstärke des Puffers diente dazu, unspezifische Wechselwirkungen der Nukleinsäuren mit dem Säulenmaterial zu verhindern (Müller und Kütemeier, 1982). Die Elution wurde mit einem UV-Spektrophotometer bei 260 nm verfolgt. Das Säuleneluat, das die Plasmid-DNA enthielt, konnte ohne weitere Salzzugabe mit Isopropanol gefällt werden.

Zusammensetzung des Säulenpuffers:

Tris/HCl pH 8.4	50 mM
EDTA	20 mM
NaCl	0.5 M

3.19. Präparation von Einzelstrang-DNA mittels Helferphagen

Das Plasmid Bluescribe M13(+) trägt auf seinem Genom eine DNA- Sequenz, welche die Verpackung des (+)- Stranges in Phagenproteine eines Helferphagen ermöglicht. Dazu werden JM101- Zellen, die rekombinantes Bluescribe enthalten, nach dem Anwachsen auf eine $OD_{600} = 0,3$ mit 0.5×10^{10} PFU Helferphagen pro ml Kultur versetzt. Nach weiterer Inkubation unter kräftiger Belüftung für 6 Stunden bei 37°C werden die Phagen aus dem Überstand gemäß dem Protokoll isoliert. Das Verhältnis Bluescribe/Helferphage war dabei etwa 1:1. Die Ausbeute betrug lediglich 3 µg/50 ml Kultur. Daher wurde dieses recht aufwendige Verfahren nur selten eingesetzt.

3.20. Reinigung von Oligonukleotiden

Die verwendeten DNA-Primer wurden auf einem Automaten zur Synthese von DNA hergestellt und dienten zur reversen Transkription von Viroid- RNA, zur Synthese von ds DNA sowie zur Sequenzierung.

Im Lauf der Primersynthese entstehen kurze Oligonukleotide als Nebenprodukte, die vom Primer abgetrennt werden müssen, um seine Spezifität zu garantieren. Nach der Abspaltung der Basenschutzgruppen durch Ammoniak und der Dimethoxytritylgruppe am 5'-Ende durch Essigsäure-Behandlung und Etherextraktion werden die kürzeren Oligonukleotide durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese vom eigentlichen Primer abgetrennt. Der Primer wird dann aus dem Gelstreifen mittels Isotachophorese eluiert.

Arbeitsablauf

(1) Das durch den DNA- Synthesizer hergestellte Oligonukleotid wurde in ammoniakalischer Lösung angeliefert und mußte zur Entfernung der Basenschutzgruppen über Nacht bei 60°C im Wärmehofen inkubiert werden.

(2) Der gesamte Synthese-Ansatz wurde in ein großes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in flüssiger Luft eingefroren. Die Probe wurde dann in der "Speed Vac" (Savant) lyophilisiert. Nach Zugabe von 500 μ l bidest. Wasser wurde erneut lyophilisiert.

(3) Der gelblich viskose Rückstand wurde in 2 ml Eisessig/Wasser (4:1 V/V) aufgenommen und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Dimethoxytritylgruppe abzuspalten. Danach wurde die Probe mit flüssiger Luft eingefroren und erneut lyophilisiert.

(4) Zur Abtrennung von organischen Verunreinigungen wurde der Rückstand in 500 μ l 20 mM NH_4OAc pH 5.4 aufgenommen und dreimal mit je 1 ml Ether extrahiert. Anschließend wurde die Probe wiederum lyophilisiert.

(5) Das Lyophilisat wurde in 100 μ l Formamid gelöst, das gerade soviel Bromphenolblau enthielt, daß man das anschließende Auftragen der Probe auf das Gel verfolgen konnte.

(6) Die Proben wurden zusammen mit einem Xylencyanol und Bromphenolblau enthaltenden Marker auf ein 20 %iges, denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen (siehe unter 3.15.3). Die elektrische Leistung während der Elektrophorese wurde auf 30 Watt limitiert.

(7) Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel vollständig in Haushaltsfolie eingewickelt. Die Oligonukleotide konnten durch Unterlegen einer Fluoreszenz-Farbstoff enthaltenden PEI-Cellulose-Platte im UV-Licht (254 nm) durch ihre Absorption sichtbar gemacht werden.

(8) Das den Primer enthaltende Gelstück wurde ausgeschnitten und zur Elution des Primers einer Isotachophorese unterworfen. Hierbei wurden allerdings Säulen mit einer Länge von 10 cm benutzt, um eine quantitative Elution des Primers aus dem harnstoffhaltigen Gelstück zu ermöglichen.

(9) Die Reinheit und Ausbeute der Primer wurde sowohl über sein UV- Spektrum als auch über Endmarkierung und nachfolgende Gelanalyse bestimmt.

3.21. Fällung von Nukleinsäuren

Die Fällung von Nukleinsäuren dient in erster Linie zur Konzentrierung sowie zur Überführung in andere Puffersysteme. Zwei verschiedene Methoden angewandt: Die Fällung mit Ethanol und mit Isopropanol.

Ethanol-fällung:

Die Ethanol-fällung ist für RNA und DNA bis hinab zu Oligonukleotiden gleichermaßen geeignet. Dabei wurde wie folgt verfahren:

Nach Bestimmung des Volumens wurde die wäßrige Nukleinsäurelösung mit einer 3 M Natriumacetatlösung auf eine Endkonzentration von 0.3 M Na^+ gebracht und 2.5 Volumina eiskalten Ethanols zugemischt. Nach einer Kühlphase (bei -20°C mindestens 2 Stunden, bei -80°C für mindestens 30 Minuten) wurden die Nukleinsäurepräzipitate abzentrifugiert. Die Wahl der Zentrifuge richtete sich dabei nach der Größe des zu zentrifugierenden Volumens:

-Volumen bis zu 2.2 ml: Sigma 2MK Kühlzentrifuge/14000 Upm

-Volumen bis zu 50 ml :Minifuge II (Christ)/5000 Upm

-Volumen bis zu 250 ml: Sorvall RC2-B mit Rotor HS4 bei 7000 Upm.

Die Dauer der Zentrifugation war von der Probenart abhängig und betrug 10 - 45 Minuten. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgegossen, der nukleinsäurehaltige Niederschlag mit 70 % (V/V) Ethanol versetzt und nochmals mindestens 10 Minuten zentrifugiert. Nach erneutem Dekantieren wurde das Nukleinsäure-Sediment im Vakuum getrocknet.

Isopropanolfällung:

Diese Fällungsmethode ist nur für DNA ab einer Größe von mindestens 70 Bp geeignet. Verglichen mit der Ethanolfällung beruht ihr Vorteil darauf, daß die zu zentrifugierende Lösung ein kleineres Volumen besitzt und daß wesentlich kürzere Inkubationszeiten erforderlich sind.

Dafür wurde die wässrige Phase auf eine Na^+ -Endkonzentration von 0.5 M gebracht. Danach wurden 0.9 Volumina Isopropanol hinzugegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde, wie bei der Ethanolfällung beschrieben, die DNA abzentrifugiert. Anschließend wurde der DNA Niederschlag mit 70 % Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

3.22. Nachweis von Nukleinsäuren

Der Nachweis von Nukleinsäuren in Polyacrylamid- und Agarose-Gelen richtete sich nach der zu erwartenden Menge. Die am häufigsten angewandte Methode war die Färbung mit Ethidiumbromid mit einer Nachweisgrenze von ca. 10 Nanogramm, während die Silberfärbung bis hinab zu 100 Picogramm noch brauchbar war. Sie ist allerdings auf Polyacrylamidgele beschränkt. Radioaktive Substanzen wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

3.22.1. Ethidiumbromidfärbung

Nach der Elektrophorese können Nukleinsäure-Fragmente in Agarosegelen und in Acrylamidgelen über die Fluoreszenz von Nukleinsäure-Ethidiumbromid-Interkalationskomplexen nachgewiesen werden. Dafür wurden die Gele 20 Minuten lang in einer Ethidiumbromidlösung mit der Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ gefärbt. Die Fluoreszenz ist im UV- Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm am intensivsten. Falls die Nukleinsäure anschließend aus dem Gel eluiert werden sollte, wurde bei 302 nm belichtet, um Strangbrüche zu vermeiden, die bei kurzwelligem UV-Licht gehäuft auftreten. Photographiert wurden die Gele mit einer Polaroid MP4 Kamera, die mit dem Filmhalter Polaroid 545 versehen war. Die Belichtungszeit bei Film 55 Pos./Neg. betrug 90 Sekunden bei Blende 5.6 oder bei Film 52 Pos. 35 Sekunden

bei Blende 5.6, wobei jeweils ein Orangefilter vorgeschaltet wurde.

3.22.2. Silberfärbung

Die Anfärbung von Nukleinsäuren mit Silber (Sammons et al. 1981; Goldman and Merrill, 1982) besitzt besonders für RNA eine deutlich höhere Empfindlichkeit als die EtBr-Methode. Sie bietet sich deshalb besonders zum Nachweis von Viroid RNA in der bidirektionalen Gelelektrophorese an. Dazu wurde die folgende Färbeprozedur durchgeführt, die sich im wesentlichen an die Methode von Goldman und Merrill anlehnt:

<u>Lösung</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Inkubationszeit</u>
A	Methanol 50 % (V/V) Eisessig 12 % (V/V)	3 Minuten
B	Methanol 10 % (V/V) Eisessig 5 % (V/V)	10 Minuten
C	K ₂ Cr ₂ O ₇ 3.4 mM HNO ₃ 3.2 mM	5 Minuten
Wasser		3x5 Minuten
D	AgNO ₃ 12 mM	20 Minuten
Wasser		2x5 Minuten
E	Na ₂ CO ₃ 280 mM Formaldehyd 0.05 % (V/V)	bis zur Entwicklung der Banden evtl. mehrmals erneuern
F	Essigsäure 1% (V/V)	Schlußfixierung

3.22.3. Autoradiographie

3.22.3. Autoradiographie

Mit dieser Methode können auf Gelen getrennte radioaktiv markierte Nukleinsäurefragmente sichtbar gemacht werden. Im Fall von Sequenzgelen wird auf das auf der Platte getrocknete Gel ein Röntgenfilm (meist Fuji Nif RX 100) gelegt und je nach erwarteter Intensität der Strahlung entweder bei Raumtemperatur oder bei -80°C (unter Verwendung einer Verstärkerfolie) exponiert. Acrylamidgele mit einer Dicke bis zu 1,5 mm werden nach Fixierung der Nukleinsäuren mit 10%iger Essigsäure auf Whatman 3MM Papier im Vakuum getrocknet. Nach der Entwicklung gibt der Film das Bandenmuster auf dem Gel wieder.

3.23. Elution von Nukleinsäuren

Für viele Versuche war es erforderlich, die elektrophoretisch aufgetrennten Nukleinsäuren wieder aus dem Gel zu isolieren. Dafür wurden je nach Problemstellung verschiedene Elutionstechniken verwendet. Die Diffusions-Elution wurde teilweise zur Wiedergewinnung von DNA aus dünnen Gelen eingesetzt. Die Isotachophorese diente zur Rückgewinnung von DNA und RNA sowohl aus Polyacrylamidgelen als auch aus Agarosegelen und besaß die größte Anwendungsbreite. Die Elektroelution aus Agarosegelstücken fand Anwendung zur präparativen Isolierung von zirkulärer und linearisierter Plasmid-DNA.

3.23.1. Diffusionselution

(1) Der ausgeschnittene Polyacrylamidgelstreifen wurde mit 600 μl Elutionspuffer (0.5 M NH_4OAc , 1mM EDTA), 10 μg tRNA und 5 μl 10 % (G/V) SDS versetzt und bei 37°C über Nacht inkubiert.

(2) Die Probe wurde in der Sigma 2MK Kühlzentrifuge 30 Minuten bei 14000 Upm abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Gelstück wurde nochmals mit Elutionspuffer versetzt, geschüttelt und erneut zentrifugiert.

(3) Die vereinigten Überstände wurden sterilfiltriert (Acro LCB, 0.45 μ m, Gelman, Product No. 4452) und anschließend auf 270 μ l Endvolumen in der "Speed Vac" eingeeengt.

(4) Anschließend wurden die Nukleinsäuren in der Probe mit Ethanol gefällt.

3.23.3. Elektroelution

Zur Elution der DNA wurde der entsprechende Gelstreifen aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in einen einseitig geschlossenen Dialyseschlauch gegeben, der zuvor durch je zehnminütiges Kochen in 2 % NaHCO_3 /1 mM EDTA und in bidest. H_2O vorbehandelt war. Nachdem der Schlauch mit 1 bis 2 ml 10 mM Tris-Acetat pH 7.8 gefüllt und dann verschlossen worden war, legte man ihn in eine Elektrophoresekommer, die mit dem gleichen Puffer gefüllt war. Die Elution der DNA erfolgte bei 75 mA und einer Elektrophoresedauer von 1 - 2 Stunden. Durch kurzes Umpolen der Elektrophoresekommer sollte erreicht werden, daß etwa an die Dialysemembran gebundene Nukleinsäuren wieder abgelöst wurden (Maniatis et al. 1982). Die Flüssigkeit, in der sich nun die Nukleinsäure befand, wurde dem Dialyseschlauch entnommen.

Für die weitere Aufreinigung der elektroeluierten DNA-Lösung wurden Elutip-d Ionenaustauscher-Säulchen (Schleicher und Schuell) verwendet. Ein Vorteil dieser Methode ist die gleichzeitige Konzentrierung und Reinigung der eluierten Nukleinsäurelösung. Die DNA wird bei niedrigen Salzkonzentrationen an die Säule gebunden und mit hohen Salzkonzentrationen wieder abgelöst.

(1) Es wurde eine 5 ml Spritze (Pharma Plast) mit 1.5 ml "Hochsalz"- Puffer gefüllt und ein Elutip-d Säulchen auf die Spritze gesetzt. Zur Aktivierung des Austauschermaterials wurde diese Lösung nun langsam durch die Säule gepreßt.

(2) Eine zweite 5 ml Spritze wurde mit 5 ml Niedrigsalz Puffer gefüllt und mit dieser das Säulchen gespült.

(3) Mit der gleichen Spritze wurde dann die DNA-haltige Lösung aufgenommen und zur Abtrennung von (Gel)-Partikel-Verunreinigungen durch ein Filter (Minisort NML SM 16534 K 0.2 um) langsam durch die Säule gepreßt.

(4) Die Säule wurde dann mit 2.5 ml "Niedrigsalz"- Puffer nachgewaschen.

(5) Nach Entfernung des Filters wurde die DNA mit 0.4 ml "Hochsalz"- Puffer eluiert. Das Eluat wurde mit Ethanol gefällt, gewaschen und getrocknet.

Zusammensetzung des Niedrigsalz- Puffers:

NaCl	0.2 M
Tris/HCl pH 7.4	20 mM
EDTA	1 mM

Zusammensetzung des Hochsalz- Puffers:

NaCl	1 M
Tris/HCl pH 7.4	20 mM
EDTA	1 mM

3.23.2. Isotachophorese

Mit Hilfe der Isotachophorese können nicht nur, wie schon lange praktiziert, Proteine getrennt werden, sondern auch Nukleinsäuren aus Gelstückchen eluiert werden (Öfverstedt et al., 1984). Auf diese Weise lassen sich somit DNA-Restriktionsfragmente und Viroide auf einfache Weise isolieren. Der Vorteil liegt in der sehr schonenden Behandlung und der fast vollständigen Wiedergewinnung des zu eluierenden Materials.

Bei der isotachophoretischen Reinigung von Nukleinsäuren dienen die Chlorid-Ionen des Tris-Puffers als Leitonen und die negativ geladenen, kaum dissoziierten und daher sehr langsam wandernden 6-Aminocapronsäureanionen als Folge-Ionen. Durch das angelegte elektrische Feld wandern negativ geladene Teilchen aus dem aufgelegten Gelstreifen durch das Gelbett zur Anode. Ungeladene Teilchen, wie etwa Harnstoff oder Agarose

sereste, verbleiben am oberen Ende des Gelbetts. In einem sich an die elektrische Separation anschließenden Gel-filtrationsschritt wird die hochmolekulare Nukleinsäure von etwa vorhandenen, elektrisch geladenen und miteluierten niedermolekularen Verunreinigungen abgetrennt.

Die Elutions-Apparatur bestand aus einer mit Sephadex gefüllten BioRad-Säule (Econo-Column, 4 bzw. 10 cm Länge und 7 mm Durchmesser), auf welche die nukleinsäure-haltigen Gelstückchen aufgebracht wurden. Die Auflagefläche auf die Säule konnte mit Hilfe eines passenden Pulvertrichters erweitert werden, um eine entsprechende Anzahl Gelstreifen nebeneinander anordnen zu können. Als untere Elektrophoresekammer mit dem (+)- Pol diente ein mit 40 mM Tris/HCl pH 8.3 gefülltes Becherglas. Die als Kathode geschaltete Platinelektrode befand sich am oberen Ende der Säule und ragte in die Capron-säurelösung (100 mM), mit der die Gelstückchen überschichtet wurden. Mit Hilfe des bei pH 8.3 negativ geladenen Farbmärkers Phenolrot, der infolge seines Molekulargewichts etwa die gleiche Ladungsdichte wie Nukleinsäuren besitzt, läßt sich der Verlauf der Elution gut verfolgen. Zur Durchführung der Elution:

(1) Sephadex G 50 fine wurde über Nacht in 40 mM Tris/HCl pH 8.3 gequollen.

(2) Zur Entfernung der Schwebteilchen, der sog."Fines", wurde das Gelmaterial anschließend mehrmals mit Tris-Puffer aufgeschwemmt und der Überstand abgesaugt. Zur Sterilisierung wurde das Material autoklaviert.

(3) Im Fall der Aufreinigung von RNA wurden alle mit den empfindlichen Nukleinsäuren in Kontakt kommenden Apparatur-teile mindestens 30 Minuten lang in 0.3 M NaOH inkubiert, um etwa vorhandene Nukleasen zu hydrolysieren. Anschließend wurden die Teile zuerst mit 5 % Essigsäure neutralisiert und danach mehrmals mit bidest. Wasser nachgespült.

(4) Tris-Puffer, Säulenmaterial und auch das mit Puffer gefüllte Säulchen wurden nun mit Ultraschall behandelt, um einer möglichen Luftblasenbildung vorzubeugen, die den Stromfluß beeinträchtigen könnte.

(5) Die Säule und der aufgesetzte Trichter wurden mit dem Gelmaterial so gefüllt, daß nach dem Absetzen die Gelstücke nicht übereinander zu liegen kamen. Nach Ablauf des Überstandes wurde die Säule am unteren Ende mit einer in Tris-Puffer gequollenen Dialysemembran verschlossen.

(6) Die zu eluierenden Gelstückchen wurden auf das Sephadex-Gelbett gelegt und ca. 2 cm hoch mit 0.1 M 6-Aminocapronsäure überschichtet.

(7) Danach wurden 3 µl Phenolrot-Lösung (1 mg/ml in 0.1 M 6-Aminocapronsäure) auf die Gelstückchen gegeben. Anschließend wurden die Platin-Elektroden angebracht.

(8) Zur Elution wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Bei präparativen Elutionen betrug sie wegen der größeren Länge der Säule zunächst 300 V und wurde auf 200 V gedrosselt, sobald der Farbstoff, der dann bereits in einer schmalen Bande konzentriert wanderte, die Grenze zwischen aufgesetztem Trichter und Säule passiert hatte.

(9) Sobald die Farbstoffbande etwa 0.5 cm oberhalb des Säulen-Endes angelangt war, wurde die Isotachophorese beendet und die Dialysemembran vom Säulenauslauf entfernt. Anschließend wurde die Nukleinsäure-enthaltende Lösung aus der Säule in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß solange austropfen lassen, bis der Farbstoff etwa zur Hälfte eluiert war.

(10) Die auf diese Weise gewonnene Nukleinsäure wurde mit Ethanol gefällt, gewaschen und getrocknet.

3.24. Molekulare Hybridisierung

Zum Nachweis von Viroid-RNA in Pflanzenproben ist die molekulare Hybridisierung die empfindlichste und sicherste Methode (Owens & Diener 1981, Herold 1986). Dabei wird die

Gesamtnukleinsäure-Fraktion der entsprechenden Pflanzenproben gewonnen. Anschließend wird die Nukleinsäure mit Hilfe von Glyoxal denaturiert. Mit denaturierten Proben ist eine mögliche Basenpaarung mit dem radioaktiv markierten, in (-) Polarität vorliegenden und damit zum Viroid komplementären Transkript am besten erreichbar. Die denaturierte Nukleinsäureprobe wird beim sog. "Dot blot"-Verfahren direkt auf die Gene Screen Hybridisierungs-Membran aufpipettiert. Bei Verwendung einer neueren Membran der Marke Gene Screen Plus ist es sogar möglich, den Denaturierungsschritt zu umgehen und rohe Pflanzenextrakte direkt aufzutragen, ohne dabei wesentlich an Nachweisempfindlichkeit einzubüßen.

Beim sog. "Northern blotting" wird die Probe vorher auf einem 5 %igen Polyacrylamid-Phosphatgel aufgetrennt und anschließend durch Elektro-Blotting auf die Membran übertragen. Nachdem durch einen "Backvorgang" bei 80°C die Nukleinsäuren auf der Hybridisierungsmembran immobilisiert worden sind, kann man mit der eigentlichen molekularen Hybridisierung beginnen.

3.24.1. Herstellung der Hybridisierungsproben

Hochspezifische und stark radioaktiv markierte Hybridisierungsproben wurden mit Hilfe der bereits erwähnten DNA-abhängigen Phagen- RNA- Polymerasen gewonnen. Dazu wurde als Template ein Plasmid gewählt, bei dem ein Insert mit doppelter CEV- Länge so zum betreffenden Promoter der verwendeten Polymerase angeordnet war, daß bei der Transkription eine RNA entstand, die aufgrund ihrer Polarität zur Viroid- RNA komplementär war und so spezifisch auch bei hoher Temperatur binden konnte.

3.24.2. Glyoxalierung der Nukleinsäuren

Einzelsträngige DNA und insbesondere RNA ist bei entsprechender Basenzusammensetzung in der Lage, intramolekulare Basenpaarungen auszubilden. Dadurch werden Teile des Moleküls zur Hybridisierung unzugänglich. Mit Glyoxal kann die Aminogruppe und das in Position 1 stehende N-Atom des Guanosins in einer zyklischen Verbindung geschützt werden (Mc-

Master und Carmichael, 1977). Dadurch wird eine Bildung von intramolekularen G-C-Paaren über Wasserstoffbrücken unmöglich gemacht. So behandelte Nukleinsäuren lassen sich nach ihrer Gelaufentrennung ganz besonders gut durch molekulare Hybridisierung nachgeweisen.

Methodik:

Die Nukleinsäure wurde in einem definierten Volumen Wasser gelöst und anschließend mit 2.75 Volumina des "DMSO - Mixes" versetzt. Dann wurde 15 Minuten bei 50°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 Volumen Auftragspuffer wurden die Proben zusammen auf das Gel aufgetragen.

Zusammensetzung des "DMSO - Mixes":

DMSO	25 Teile
Natriumphosphat (500 mM pH 6.5)	1 Teil
10 % SDS	1 Teil
Glyoxal	9.7 Teile

3.24.3. "Dot blot"-Analyse

Beim "Dot blot"-Verfahren werden die zu testenden Proben auf eine Hybridisierungs-membran aufgebracht. Dazu wird ein sandwichartig gebautes Gerät benutzt. Dieses besitzt an der Oberseite in einer Matrix von 8x12 insgesamt 96 Bohrungen. In einer Zwischenschicht befindet sich die angefeuchtete Membran auf Whatman 3 MM Papier. Unter diesem sind ebenfalls Bohrungen angebracht, durch die beim Anlegen eines Vakuums die Auftragslösung abgesaugt werden kann. Das Verfahren hat zwar den Vorteil, daß sehr viele Proben gleichzeitig untersucht werden können, allerdings wird hierbei auf eine Auftrennung der Nukleinsäuren nach ihrer Größe verzichtet, was im Falle unspezifischer Hybridisierungssignale die Sicherheit des Testes einschränkt, weil die Größe der Nukleinsäure als zusätzlicher Parameter fehlt.

Das Volumen der glyoxalierten Proben wurde mit 10x SSC auf 200 ul gebracht. Die Proben wurden dann jeweils durch die entsprechende Öffnung der Dot Blot Apparatur auf die Gene Screen

Membran pipettiert. Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde die Flüssigkeit durch den Filter abgezogen. Anschließend wurde mit jeweils 300 μ l 10x SSC nachgewaschen. Die Membran wurde dann bei 80°C für 2 Stunden im Vakuum "gebacken".

3.24.4. "Northern blot"-Analyse

Um einzelne Nukleinsäuren in einem Gemisch spezifisch nachweisen zu können, werden sie zuerst elektrophoretisch in einem Gel aufgetrennt und dann auf eine Hybridisierungsmembran übertragen. Im Fall von RNA nennt man diesen Vorgang "Northern blotting", um es von dem zuerst von Southern (1975) für DNA entwickelten "Southern blotting" zu unterscheiden. Die Übertragung der Nukleinsäuren vom Gel auf die Membran erfolgt dabei mit Hilfe des elektrischen Stroms und wird als "Elektroblotting" bezeichnet. Die nachfolgend beschriebene Methode ist eine Kombination der verschiedenen von Wahl et al., (1979), Stellwag und Dahlberg (1980), Thomas (1980), Bittner et al. (1980) sowie von Meinkoth und Wahl (1984) praktizierten Techniken.

Die 15 Minuten in 25 mM Natriumphosphat pH 6.5 eingelegte Hybridisierungsmembran wurde auf das Phosphatgel so aufgebracht, daß keine Luftblasen entstehen konnten, die den nachfolgenden Transfer behindern. Diese Doppelschicht wurde beidseitig mit je 2 in Phosphatlösung getauchten Papieren (Whatman 3MM) und mit dünnen Scotch Brite Schwämmen belegt. Das so entstandene Paket wurde in die 3 l Puffer (25 mM Natriumphosphat pH 6.5) fassende Elektro-Blotting-Apparatur gesenkt. Die Temperatur des Puffers wurde mit Hilfe einer eingebauten Kühlung konstant bei 4°C gehalten. Der Elektro-Transfer wurde für 1 Stunde bei 1000 mA und anschließend für 1.5 Stunden bei 1300 mA durchgeführt. Anschließend wurde die Hybridisierungsmembran 2 Stunden im Vakuumofen bei 80°C "gebacken", um die Nukleinsäure auf der Membran zu fixieren.

3.24.5. Molekulare Hybridisierung

Die Technik der molekularen Hybridisierung beruht auf dem Prinzip der Paarung komplementärer Basen und dient dem spezifischen Nachweis von Nukleinsäuren. Zum Nachweis viroidspezifischer Sequenzen wurde eine vom entsprechenden CEV-Klon transkribierte und dabei radioaktiv markierte RNA-Probe eingesetzt. Die Spezifität der Basenpaarung läßt sich durch die Wahl der Hybridisierungstemperatur beeinflussen. Während man bei niederen Temperaturen (45-60°C) nur eine gering spezifische Hybridisierung erhält, ergeben Hybridisierungen bei höheren Temperaturen (75°C) nur noch solche Proben ein Signal, die wenigstens 80 % Sequenzhomologie zur Hybridisierungsprobe aufweisen. Der Hybridisierungsprozeß läßt sich in drei Abschnitte unterteilen:

(A) Bei der Prä-Hybridisierung wird die Hybridisierungsmembran mit "Prä-Hybridisierungspuffer" inkubiert, der eine unspezifische Nukleinsäure wie z.B. tRNA enthält, die zur Absättigung der freien Membranbindungsstellen dient.

(B) Im Verlauf der eigentlichen Hybridisierung wird dann die Membran mit Hybridisierungspuffer inkubiert, der zusätzlich die radioaktiv markierte Hybridisierungsprobe, die als "Nachweis-Sonde" benutzt wird, enthält.

(C) Das anschließende Waschen der Hybridisierungsmembran dient der Entfernung von unspezifisch gebundener, radioaktiv markierter Hybridisierungsprobe.

Methodik des Hybridisierungsvorgangs:

(1) Die Hybridisierungsmembran mit den immobilisierten Proben wurde zusammen mit 10 ml Prähybridisierungspuffer in einem durch einen Gummistopfen verschlossenen 100 ml Plastik-Meßzylinder 2 Stunden bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur (je nach Spezifität 60°C - 75°C) in einem Inkubationsschrank unter Rotation inkubiert.

(2) Anschließend wurde der Puffer gewechselt. Der zugegebene Hybridisierungspuffer enthielt ca. 10^7 cpm radioaktiv markierte Hybridisierungsprobe, die zur Denaturierung zuvor mit dem gleichen Volumen Puffer 2 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt worden war.

(3) Nach einer Inkubationszeit von ca. 12 - 16 Stunden wurden die Blotmembranen gewaschen, indem zunächst zweimal mit 50 ml 2x SSC je 5 Minuten bei Raumtemperatur, dann zweimal mit 50 ml 2x SSC-0.5% (G/V) SDS je 30 Minuten bei Hybridisierungstemperatur und schließlich noch zweimal mit 50 ml 0.1x SSC je 30 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen wurde.

(4) Die Hybridisierungsmembran wurde an der Luft getrocknet, in Plastikfolie eingeschweißt und durch Auflegen eines Röntgenfilms bei -80°C autoradiographiert.

Zusammensetzung der Lösungen:

20xSSC:

NaCl	3 M
Natriumcitrat	0.3 M
autoklaviert	

Prähybridisierungspuffer:

20x SSC	25 % (V/V)
Polyvinylpyrrolidon	0.02 % (G/V)
Ficoll 400	0.02 % (G/V)
SDS	1 % (G/V)
tRNA	250 ug/ml
Formamid	50 % (V/V)

Das eingesetzte Formamid wurde zuvor zweimal umkristallisiert und deionisiert.

Hybridisierungspuffer:

wie Prähybridisierungspuffer, jedoch zusätzlich:
radioaktiv markierte Probe (10^7 cpm)

3.25. Sequenzierungen

Es gibt inzwischen eine ganze Reihe von Sequenzierungsmethoden, die aber alle im wesentlichen auf zwei verschiedenen Prinzipien beruhen. Während bei der einen Methode chemische Reaktionen zur definierten Spaltung der DNA eingesetzt werden, verwendet die andere Methode DNA-synthetisierende Enzyme. Beide Methoden kamen im Verlauf der Arbeit in verschiedenen Varianten zum Einsatz.

3.25.1. Chemische Methode nach Maxam-Gilbert

Eine der ersten beschriebenen Methoden zur Sequenzierung von DNA beruht auf basenspezifischen, kinetisch kontrollierten chemischen Modifikationen und einer anschließenden Spaltung der endmarkierten DNA (Maxam und Gilbert, 1977). Die entstehenden Produkte unterschiedlicher Länge werden in separaten Spuren auf einem Gelsystem so aufgetrennt, daß Längenunterschiede von einem Nukleotid deutlich erkannt werden können. Aus dem durch Autoradiographie erhaltenen Bandenmuster läßt sich dann die Basensequenz regelrecht ablesen. Diese Sequenzierungsmethode ist sowohl für einzelsträngige als auch für doppelsträngige Formen der DNA verwendbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde z.B. die Sequenz des doppelsträngigen Inserts vom zuerst erhaltenen CEV- Klon mit dieser Methode bestimmt. Dazu wurden nach dem Herausschneiden der monomeren CEV- Einheit die 5'-Enden dephosphoryliert und mit ^{32}P markiert. Anschließend wurde die DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym in zwei unterschiedlich lange Fragmente, die jetzt nur noch eine Markierung trugen, zerlegt und über Gelelektrophorese gereinigt. Diese beiden Fragmente konnten dann nach Gaxam-Gilbert sequenziert werden.

Zur Bestimmung der Sequenz von endmarkierter cDNA, die durch reverse Transkription von Viroid-RNA erhalten wurde, konnte diese Methode ebenfalls eingesetzt werden.

Die Sequenzierungsreaktionen wurden nach einem Schema in Maxam und Gilbert (1980) und leicht veränderten Reaktionszeiten durchgeführt:

Procedure 10: Spaltung an G,	3 Minuten
Procedure 11: Spaltung an G+A	90 Minuten
Procedure 12: Spaltung an C+T	6 Minuten
Procedure 13: Spaltung an C	6 Minuten

3.25.2. Enzymatische Methoden

Eine andere Methode zur Sequenzierung von DNA ist enzymatischer Natur (Sanger and Coulson, 1975, 1977; Sanger et al, 1980). Sie kann in ihrer ursprünglichen Form auf einzelsträngige DNA und in einem modifizierten Verfahren auch auf doppelsträngige DNA angewandt werden.

3.25.2.1. Einzelstrang-DNA

Ausgehend von einem DNA-Einzelstrang, dessen Herstellung aus dem Plasmid Bluescribe bereits beschrieben wurde, wird der dazu komplementäre Strang mit Hilfe des Klenow- Enzyms und eines spezifischen Oligonukleotidprimers synthetisiert. In vier verschiedene Reaktionsansätze werden 2',3'-Dideoxynukleotide zugegeben, so daß basenspezifische Kettenabbruchreaktionen erfolgen, die in etwa gleichmäßig über die DNA verteilt sein sollten. Die Markierung der Reaktionsprodukte erfolgt durch Zugabe von ^{32}P alpha-dATP und ist somit im Vergleich zur Maxam-Gilbert-Sequenzierung wesentlich häufiger, was bewirkt, daß die Reaktionsprodukte stärker radioaktiv markiert sind. Die vier Reaktionsemische werden auf geeigneten Gelsystemen nebeneinander aufgetrennt. Mit diesem System konnte die Sequenz der DNA bis zu einer Länge von etwa 250 Nukleotiden ermittelt werden. Es wurde hauptsächlich angewandt, wenn die unten beschriebene Methode der Plasmidsequenzierung nicht zum gewünschten Erfolg führte, da der Arbeitsaufwand infolge der Einzelstrangerzeugung ungleich größer war. Zu Einzelheiten wird daher auf die Plasmidsequenzierung verwiesen, da die Vorgehensweise in beiden Fällen fast identisch ist.

3.25.2.2. Doppelstrang-DNA

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA nach der Methode des Kettenabbruchverfahrens ist etwas jüngeren Datums (Smith

et al., 1979; Wallace et al., 1981; Hong, 1982). Hierbei wurden allerdings durchweg linearisierte Plasmide verwendet.

Die Sequenzierung von DNA direkt aus dem Plasmid in seiner "supercoiled"-Form nach Chen und Seeburg (1985) beruht ebenso wie das Verfahren nach Sanger auf der enzymatischen Synthese eines radioaktiv markierten, zu einem der beiden Plasmidstränge komplementären Stranges. Dies wurde dadurch ermöglicht, daß in den verwendeten Vektoren Sequenzen enthalten sind, die weiterhin den Einsatz der bisher gebräuchlichen Primer erlauben (Messing et al., 1981). Der einzige Unterschied der beiden Verfahren besteht darin, daß nach der Methode von Sanger einzelsträngige DNA und bei Chen und Seeburg doppelsträngige Plasmid-DNA eingesetzt wird, die allerdings vor der Reaktion denaturiert werden muß. Zur Verfeinerung dieses Verfahrens, das in den letzten Jahren weite Verbreitung gefunden hat, sind zahlreiche Publikationen erschienen (z.B. Korneluk et al., 1985; Hattori und Sakari, 1986; Mizusawa et al., 1986). Viele der dort beschriebenen Verbesserungen, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, haben im Lauf dieser Arbeit Eingang in die Laborpraxis gefunden. Die unten dargestellte Vorgehensweise stellt somit die Methode dar, am Ende dieser Arbeit praktiziert wurde.

Lösungen:

Denaturierungspuffer:

NaOH	200 mM
EDTA	0.2mM

2 M Ammoniumacetat pH 4.5

DTT-Stammlösung:

1 M DTT gelöst in 0.01 M NaAc pH 5.2, sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt

10x "Annealing"-Puffer

Tris/HCl pH 7.5	70 mM
MgCl ₂	70 mM
NaCl	200 mM
DTT	150 mM

Nukleotidlösungen:

Von der Fa. Pharmacia sind Nukleotidlösungen erhältlich, die über präparative HPLC gereinigt wurden und weitgehend frei von Verunreinigungen sind, wie sie beim Lyophilisieren von Nukleotiden entstehen. Diese Verunreinigungen können zu zusätzlichen, unerwünschten Kettenabbrüchen führen. Aus den 100 mM Stammlösungen wurden die folgenden Arbeitslösungen angesetzt:

Desoxynukleotide: 0.5 mM Lösungen

Didesoxynukleotide: 2 mM Lösungen

"Chase"-Lösung:

je 125 uM dNTP

Reaktions-Gemische

<u>Nukleotid</u>	<u>A-Mix</u>		<u>C-Mix</u>		<u>G-Mix</u>		<u>T-Mix</u>	
	ul	uM	ul	uM	ul	uM	ul	uM
dTTP	40	100	40	100	40	100	2	5
dCTP	40	100	4	10	40	100	40	100
dGTP	40	100	40	100	2	5	40	100
ddTTP							50	500
ddCTP			10	100				
ddGTP					12	120		
ddATP	10	100						
H ₂ O	50		86		86		48	

10x Annealing- Puffer: jeweils 20 ul

Diese "Mixe" wurden in 2 ul- Portionen abgefüllt, eingefroren und entsprechend der bei den jeweiligen Sequenzierungen benötigten Mengen wieder aufgetaut.

Auftragslösung:

entionisiertes Formamid	98 %
EDTA pH 8.0	10 mM
Bromphenolblau	0.2%
Xylencyanol	0.2%

Aliquots wurden bei -20°C aufbewahrt.

Verwendete Primer:

(1) "17mer M13 sequencing primer" (Biolabs)
dGTAAAACGACGGCCAGT

(2) "M13 reverse sequencing primer" (Boehringer)
dAACAGCTATGACCATG

(3) T7 specific primer (VCS):
dAATACGACTCACTATAG

(4) T3 specific primer (VCS):
dATTAACCCTCACTAAAG

Radioaktive	Substrate:
(1) alpha- ³² P-dATP	spezifische Aktivität 800 Ci/mmol
(2) alpha- ³⁵ S-dATP	spezifische Aktivität 600 Ci/mmol

Zu den Reaktionen im einzelnen:

A. Denaturierung:

Die Plasmid-DNA kann wahlweise alkalisch oder durch Hitze denaturiert werden.

1. Hitze-Denaturierung

Die DNA (1-2 ug) wurde in 5.5 ul TE Puffer gelöst, mit 1 ul 10x "Annealing"-Puffer und 1 ul Primer (2.5 uM) gemischt und 3 Minuten bei 100°C im kochenden Wasserbad inkubiert. An-

schließend wurden die Proben sofort in flüssiger Luft abgeschreckt, um eine Renaturierung zu verhindern.

2. Alkali-Denaturierung

Zu der in 4 μ l TE Puffer gelösten Plasmid-DNA wurden 40 μ l frisch zubereiteter Denaturierungspuffer gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden gleichzeitig 4 μ l 2 M NH_4Ac pH 4.5 und 100 μ l kaltes Ethanol p.a. (-20°C) hinzupipettiert und 30 Minuten bei -80°C inkubiert. Nach der Zentrifugation (Sigma, 20 min, 15000 Upm, 4°C) wurde mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert und das Sediment in der "Speed Vac" (Savant) getrocknet.

B. Hybridisierung des Primers an die denaturierte DNA ("Annealing")

Nach Alkalidenaturierung wurden zu der DNA folgende Bestandteile pipettiert:

Primer (2.5 μM)	1 μ l
10x Annealing Puffer	1 μ l
H_2O	5.5 μ l
alpha- ^{32}P -dATP	2.5 μ l

Hierauf wurde 15 Minuten bei 40°C im Wasserbad inkubiert.

C. Sequenzierungsreaktionen

Nach dem Annealing erfolgte die Zugabe von 1 μ l Klenow-Enzym und im Fall der Hitzedenaturierung außerdem der radioaktiven Bestandteile. Es wurde gemischt und jeweils 2 μ l auf 4 verschiedene Reaktionsgefäße verteilt, in denen sich jeweils 2 μ l einer der bereits beschriebenen Reaktionsgemische (A, G, C, T) befand.

Die Reaktion wurde durch kurzes Abzentrifugieren der an den Rand pipettierten Tropfen gestartet und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 1.5 μ l "Chase"-Lösung in jedes der vier Reaktionsgefäße pipettiert und die Inkubation weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur fortgesetzt.

Zur Beendigung der Reaktion und zur weitgehenden Entfernung des Wassers wurden sie mit 4 μ l Probenpuffer versetzt und 15 Minuten lyophilisiert.

Vor dem Auftragen auf ein Polyacrylamidgel wurden die Proben denaturiert, indem sie 4 Minuten im Wasserbad gekocht und sofort in flüssiger Luft abgeschreckt wurden. Von jeder Probe wurde etwa 0.5-1 μ l aufgetragen.

3.25.3. Sequenzierung von RNA aus Pflanzen

Zur Sequenzierung von Viroid-RNA aus Pflanzenextrakten wurden Proben eingesetzt, die wie in Kapitel 3.16.2 beschrieben über HPLC gereinigt worden waren.

Dazu wurde die RNA mit einem zuvor endmarkierten Primer gemischt, bei 80°C für 2 Minuten denaturiert und in flüssiger Luft abgeschreckt. Nach Zugabe eines "Mixes", der die Komponenten für die reverse Transkription enthielt, wurde für 2 Stunden bei 37°C mit 200 U reverser Transkriptase (BRL) inkubiert. Anschließend wurde das RNA-Template durch Zugabe von 5 μ g RNase A und 15-minütige Inkubation abgebaut und die cDNA durch einmalige Phenolisierung von den Enzymen abgetrennt. Über eine Biogelsäule wurden die nichteingebauten Nukleotide entfernt. Die radioaktiven Transkripte wurden nach Fällung auf einem denaturierenden Gel der Größe nach aufgetrennt. Transkripte mit einer Länge von über 200 Nukleotiden wurden mittels Isotachophorese aus dem Gel eluiert und nach Maxam-Gilbert sequenziert.

3.26. Infektiositätstest

Um die Infektiosität von klonierter Viroid-DNA und ihrer entsprechenden RNA-Transkripte zu bestimmen, wurden Pflanzen herangezogen, auf denen sich das Viroid möglichst schnell vermehrt und die zudem durch eine ausgeprägte Symptomatik eine erste Diagnose erleichtern.

Für die Infektionsversuche wurden Testpflanzen der Komposite *Gynura aurantiaca* und der Tomatensorte *Rentita* verwendet. Beide Pflanzenarten unterscheiden sich in der Weise, daß die

Ausprägung von CEV-Symptomen auf *Gynura* stärker ist als auf Tomate. Andererseits läßt sich die CEV RNA aus Tomatenblättern leichter isolieren als aus *Gynura*-Blättern, da diese sehr viel störende sekundäre Stoffe enthalten.

Zur Inokulation der Pflanzen wurden die Proben in einem definierten Volumen 1 %igem (G/V) K_2HPO_4 aufgenommen, von dem dann pro Pflanze 100 μ l verwendet wurde. Die Inokulation von *Gynura* erfolgte in der Weise, daß die Nukleinsäurelösung auf den Stengel unterhalb des ersten Blattes aufgetropft wurde. Anschließend wurde der Stengel durch diese Lösung hindurch mit einem spitzen Skalpell mehrfach angestochen. Im Fall von Tomate wurden die Proben mit Hilfe eines Glasspatels auf die Spitzenblätter junger Pflanzen "abgerieben", nachdem diese zuvor mit Carborund eingestäubt waren, um während des Abreibens auf der Blattoberfläche kleine Verletzungen zu erzeugen, durch welche die Viroidlösung in die Blattzellen eindringen konnte.

Die Pflanzen wurden dann vier bis sechs Wochen unter möglichst konstanten Bedingungen, d.h. einer Temperatur von 24 - 28°C und natürlichem Tageslicht im Gewächshaus gehalten. Zu Zeiten mit geringer Tageslänge wurden die Pflanzen zusätzlich mit künstlichen Lichtquellen in einer Stärke von ca. 30 000 Lux beleuchtet.

In regelmäßigen Zeitabständen wurde dann der Zustand der Pflanzen protokolliert, wobei insbesondere auf die Ausprägung von CEV-spezifischen Krankheitssymptomen geachtet wurde. Zum Viroidnachweis mittels Elektrophorese und molekularer Hybridisierung wurden von den Pflanzen Blattproben mit sterilen, nach jeder Pflanze ausgetauschten Rasierklingen abgeschnitten.

3.27. Sekundärstrukturberechnung

Von den im Verlauf der Arbeit konstruierten Mutanten wurde mit Hilfe eines Rechenprogramms die unter thermodynamischen Gesichtspunkten stabilste Sekundärstruktur berechnet (Freier et al., 1986). Aus den daraus resultierenden Strukturvorschlägen konnten dann mittels eines Zeichenprogramms (B. Haas) die wahrscheinlichen Strukturen graphisch dargestellt werden.

4. Ergebnisse

Bei der nachfolgenden Darstellung der Ergebnisse werden im Zusammenhang mit der Sequenz von Viroiden bestimmte Begriffe gebraucht, deren Bedeutung hier zu Beginn kurz definiert werden soll.

Die Viroid RNA innerhalb einer Pflanze kann entweder aus strukturell einheitlichen Molekülen bestehen oder aus einer Population von RNA Molekülen zusammengesetzt sein, die sich dadurch voneinander unterscheiden, daß sie an einigen Stellen bestimmte Basenaustausche aufweisen. Im ersten Fall handelt es sich um ein strukturell klar definiertes Viroid-Isolat. Im zweiten Fall wird die Gesamtheit der Viroid-RNA dann als Viroid-Population bezeichnet, die aus einzelnen, voneinander verschiedenen Sequenz-Varianten besteht. Diejenige Nukleotidabfolge, die zu den Sequenzen der Varianten die größte Ähnlichkeit aufweist, wird in Anlehnung an die auf Untersuchungen von RNA Phagen beruhenden Überlegungen von Schuster (1983) und Biebricher (1983) als sog. "Mastersequenz" bezeichnet. Die Homologie zwischen den Sequenzen der Viroid-Varianten und ihrer Mastersequenz ist nach den gegenwärtigen Kenntnissen größer als 90%.

Polarität:

Das Numerierungssystem von Gross et al. (1978) für die Position der einzelnen Nukleotide innerhalb des stäbchenförmigen Sekundärstruktur-Modells der an sich zirkulären Viroid-RNA wurde auf die Doppelstrang-cDNA so übertragen, daß derjenige DNA-Strang (+) Polarität besitzt, der vom 5'-zum 3'-Ende gelesen die gleiche Nukleotidreihenfolge wie die RNA aufweist. Dies bedeutet z.B., daß die Reihenfolge der Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme bei der Viroid cDNA im Uhrzeigersinn unmittelbar auf die RNA übertragen werden kann. Der dazu komplementäre Strang besitzt demnach (-) Polarität. Hier ist die Reihenfolge der Erkennungsstellen naturgemäß genau umgekehrt wie bei der Viroid RNA.

Orientierung:

Bei den verwendeten Plasmiden ist nach Konvention die Reihen-

folge der Nukleotide auf dem nicht-kodogenen Strang aufgeführt. Bei Verknüpfung der Viroid cDNA mit diesem Strang wird deren Orientierung als (+) Orientierung bezeichnet. Dies ist insbesondere dann wichtig, wenn die Art der Insertion eines DNA-Fragments mit identischen Enden bestimmt werden soll.

Aufgrund dieser Definitionen wird durch die *in vitro* Transkription einer Viroid-DNA in Viroid RNA mit Hilfe der SP6- oder T3 bzw. T7 RNA Polymerase in (+) Orientierung dann eine Viroid-spezifische (+)-RNA gewonnen, wenn der Promoter für die RNA-Polymerase am 3'-Ende der Viroid-DNA lokalisiert ist. Diese RNA wird in 5'-3'-Richtung synthetisiert und als Matrize dient dabei der kodogene, komplementäre cDNA Strang.

4.1. Klonierung des CEV

Das primäre Ziel dieser Arbeit bestand in der Konstruktion eines infektiösen CEV- Klonen, mit dessen Hilfe auf den entsprechenden Testpflanzen eine CEV- Vermehrung und CEV- spezifische Krankheitssymptome ausgelöst werden konnte. Daß dies grundsätzlich möglich ist, wurde bereits bei verschiedenen Viroiden gezeigt. So erwiesen sich verschiedene Formen klonierter Viroid DNA wie z.B. die von PSTV (Tabler, 1986), CEV (Visvader et al., 1986), CSV (Haseloff et al., 1981) und von HSV (Meshi et al., 1984) als hoch infektiös.

Auf dieser klonierten Form des CEV basierten alle weiteren in der vorliegenden Arbeit angewendeten gentechnischen Methoden, so daß die Klonierung sozusagen die "Schlüsseltechnik" zu allen anderen Experimenten darstellte .

Nachdem die Sequenz von einigen CEV Isolaten bereits bekannt war (Gross et al., 1982; Visvader et al., 1982), konnte daraus eine Sekundärstruktur abgeleitet werden, die der im Fall des PSTV berechneten sehr ähnlich ist. Abb.1 zeigt die nach thermodynamischen Parametern berechnete Struktur des Isolates CEV-CG1. Es war innerhalb unserer Arbeitsgruppe aufgereinigt und über seine cDNA sequenziert worden (Haas et al., unpubliziert). Dabei hatte sich bereits gezeigt, daß in der verwendeten CEV- haltigen Probe mehrere Sequenz-Varianten ent-

halten sein mußten, die sich dadurch voneinander unterscheiden mußten, daß sie an mehreren Stellen Basenaustausche aufwiesen. Es handelt sich im Fall der ermittelten Sequenz von CEV-CG1 also um eine "Mastersequenz" derjenigen Varianten, die in den zur Extraktion verwendeten Pflanzen vorkamen (Haas, persönliche Mitteilung). Die Erkennungsstellen für die im Verlauf der vorliegenden Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind im Modell in ebenfalls eingezeichnet. Mit einem Teil dieser Probe wurde die anschließend beschriebene Klonierung durchgeführt.

4.1.1. Strategie

Zur Klonierung des CEV sollte mit reverser Transkriptase eine cDNA erzeugt, diese zum Doppelstrang vervollständigt und nach Behandlung mit geeigneten Restriktionsenzymen in ein Plasmid einkloniert werden. Es wurde dabei zunächst die Methode versucht, mit deren Hilfe Gubler und Hoffmann (1983) die cDNA seltener mRNAs kloniert hatten. Mit dieser Technik hätte die Klonierung eigentlich innerhalb weniger Tage erreicht werden können. Als dies jedoch im Fall des CEV scheiterte, wurde auf ein mehr klassisches Verfahren zurückgegriffen, mit dem durch die Verwendung mehrerer Primer die gezielte Klonierung möglich sein sollte. Der Vollständigkeit halber sind beide Verfahren im folgenden skizziert.

4.1.1.1. Klonierungsmethode nach Gubler und Hoffmann

Bei der zunächst gewählten Klonierungsstrategie (Abb.3.) handelt es sich um eine Methode, die von Gubler und Hoffmann (1983) ursprünglich zur Klonierung seltener mRNAs verwendet wurde und die nun für die Viroid-Klonierung leicht abgeändert wurde. Das Viroid wird zunächst zusammen mit einem geeigneten Primer gemischt, dann bei 80°C denaturiert und anschließend einer reversen Transkription unterworfen. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen renaturiert der Primer und die Viroid RNA zu einem RNA/DNA Hybrid, allerdings auch zum Teil wieder die selbstkomplementären Bereiche der Viroid RNA. Die Synthese des zweiten DNA- Strangs erfolgt mit einem Enzymgemisch aus RNaseH, DNA Polymerase sowie DNA Ligase.

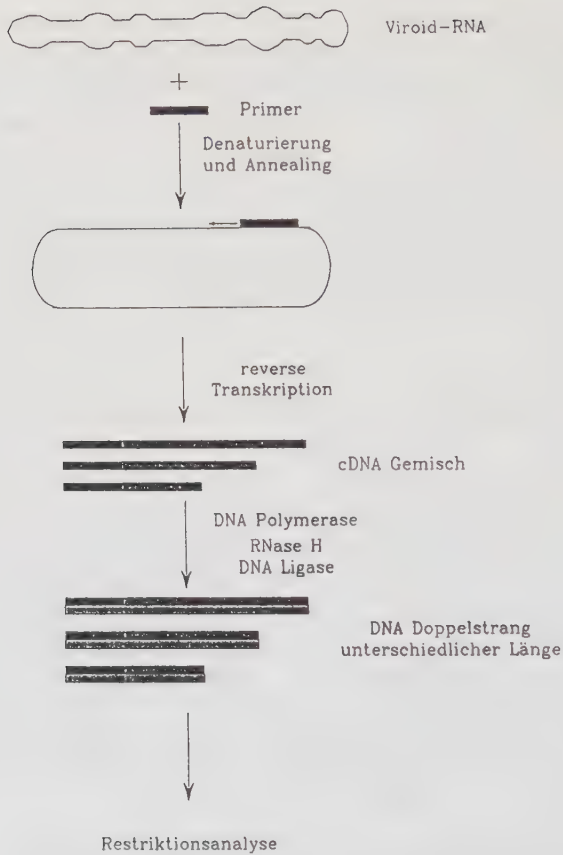


Abbildung 3: Skizzierung der Viroidklonierung unter Anwendung der Methode von Gubler und Hoffmann (1983) für die Klonierung seltener mRNAs entwickelter Methode.

Das oben abgebildete Schema stellt die zunächst versuchte, aber nicht geglückte Methode zur Klonierung des CEV dar.

- 1) Die Viroid-RNA wird zusammen mit dem Primer denaturiert
- 2) Durch die anschließende reverse Transkription entsteht einzelsträngige cDNA unterschiedlicher Länge.
- 3) Diese cDNA wird dann zum Doppelstrang ergänzt, indem in einem Reaktionsgefäß DNA Polymerase I und DNA Ligase (beide aus E.coli) sowie RNase H zugegeben wird.
- 4) Das entstandene Gemisch von ds DNA wird dann einer Restriktionsanalyse unterworfen, um die Länge der dabei entstandenen Reaktionsprodukte zu ermitteln.

Die RNase H ist für RNA Doppelstränge bzw. DNA-RNA Hybride spezifisch und verdaut in diesem Ansatz das Viroid-Template. Die DNA Polymerase aus E.coli synthetisiert nun den zweiten, zur cDNA komplementären Strang in Form von aneinandergrenzenden Teilstücken. Die Verbindungen zwischen diesen Teilstücken werden durch die DNA Ligase geschlossen. Das in diesem "Eintopfverfahren" entstandene Gemisch unterschiedlich langer ds DNA wird anschließend zur Analyse mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, die, je nach eingesetztem Primer, DNA- Stücke mit definierter Maximallänge erzeugen sollten.

Das Ergebnis dieser Restriktionsverdaus zeigte, daß tatsächlich ds DNA entstanden war, da nach dem Verdaus mit geeigneten Restriktionsenzymen verschieden lange DNA- Fragmente nachgewiesen werden konnten. Bei den Verdaus jedoch, bei denen DNA- Fragmente von ganzer Viroidlänge hätten entstehen müssen, fehlten hingegen 20-40 Bp. Das bedeutete, daß bei den reversen Transkriptionen entweder zu wenige oder gar keine Produkte mit voller Viroid-Länge oder größer entstanden sind. Daher schied diese Methode aus prinzipiellen Gründen für die Viroidklonierung aus.

4.1.1.2. Methode der primerkontrollierten Viroid-cDNA- Synthese

Analytische reverse Transkriptionen mit CEV und PSTV in Gegenwart der viroid-spezifischen Primer P14b, P15a und P15b (siehe Kapitel 3.6) zeigten, daß nur beim PSTV Transkripte der vollen Länge, d.h. von ca. 360 Nukleotiden in größerer Ausbeute entstanden waren. beim CEV hingegen war die Ausbeute an cDNA voller Länge so gering, daß es wenig sinnvoll erschien, dieses Viroid in einem Schritt zu klonieren. In Abb. 4 ist die daraufhin durchgeführte Klonierung des CEV aus Teilstücken schematisch dargestellt.

Das CEV sollte in zwei nahezu gleichgroßen Hälften kloniert werden, die anschließend zu einer Einheit zusammengesetzt werden können, die das komplette Genom des CEV repräsentiert. Sowohl zur Synthese der cDNA als auch bei ihrer Vervollstän-

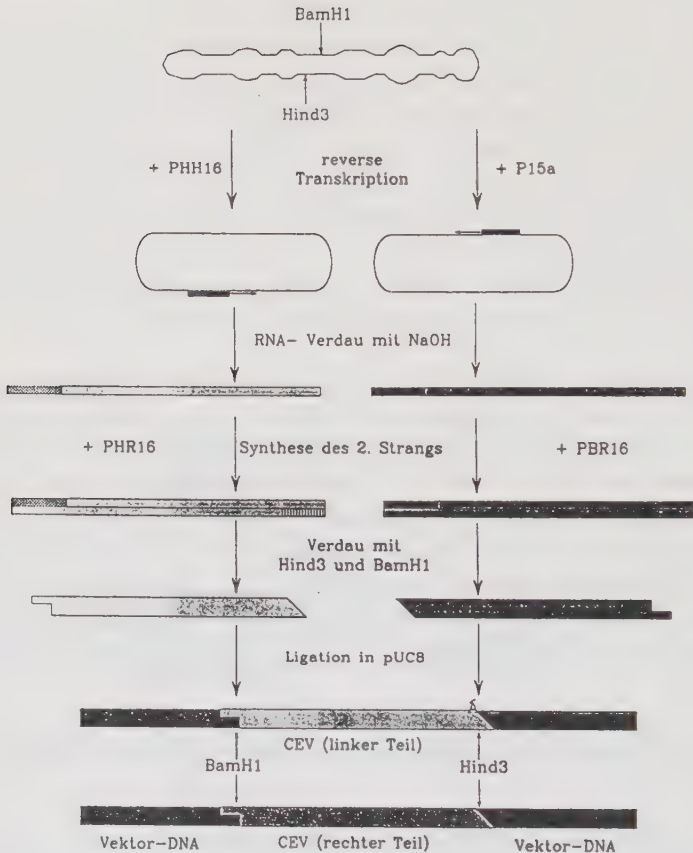


Abbildung 4: Schema der Klonierung des CEV aus zwei unabhängig gewonnenen Teilstücken

Die CEV RNA wird zunächst mit den Primern P15a bzw. PHH16 revers transkribiert. Anschließend wird das Viroid-Template durch Zugabe von NaOH abgebaut.

Dann erfolgt die Synthese des zweiten Strangs mit Klenow Polymerase (großes Fragment) und den "Rück"-Primern PBR16 bzw. PHR16.

Nach Behandlung der Enden der ds DNA mit BamHI und HindIII entstehen so DNA-Fragmente, welche jeweils die "rechte Hälfte" (von der HindIII Stelle 287 zur BamHI Stelle 89) und die "linke Hälfte" (von der BamHI Stelle zur HindIII Stelle) des Viroids repräsentieren.

Die Klonierung erfolgt anschließend im Vektor pUC 8, der zuvor mit BamHI und HindIII gespalten wurde.

digung zum Doppelstrang sollten Oligodeoxynukleotide eingesetzt werden, die folgenden Kriterien genügen mußten:

(1) Die Primer sollen an der CEV- RNA in Regionen binden, wo möglichst keine Mutationen vorkommen. Da bekannt war, daß die zur Verfügung stehende CEV- Probe aus einem Gemisch mehrerer Sequenz-Varianten besteht, ist diese Bedingung vermutlich am ehesten in der zentralen konservierten Region des CEV erfüllt, die, wie der Name bereits sagt, bei allen Viroiden streng konserviert ist (siehe Sängler 1982, 1984).

(2) Die Bindungsregion sollte außerdem über ungepaarte Bereiche verfügen, um dem Primer eine gute Bindung zu ermöglichen.

(3) Weiterhin sollten die Primer eine Länge von 15 - 20 Nukleotiden aufweisen, um hinreichend spezifisch Viroidmoleküle aus dem Gemisch vieler verschiedener RNAs "herauszufischen".

(4) Um zu vermeiden, daß während der Polymerase- Reaktionen möglicherweise auftretende Fehler im Einbau von Nukleotiden (Haas, persönliche Mitteilung) zur Zerstörung von Erkennungsstellen führen, die für die zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme benötigt werden, sollten die Primer diese Sequenzen bereits enthalten.

Die nach diesen Kriterien ausgewählten Primer und ihre Bindungsstellen sind in Abb. 5 dargestellt. Ihre Sequenz wurde bereits im Kapitel 3.6 aufgeführt.

Zur Klonierung sollte das Plasmid pUC8 verwendet werden. Beim Vergleich der in seinem Polylinker enthaltenen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme und der Sequenz der CEV-spezifischen ds cDNA stellte sich heraus, daß sich die Enzyme BamH1 und Hind3 am besten für die Klonierung des CEV eignen sollten.

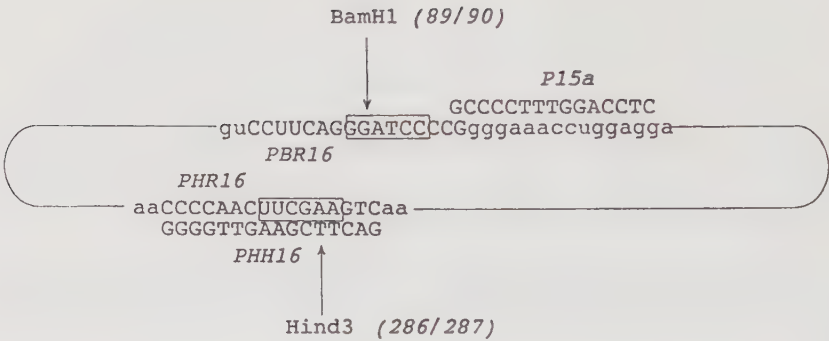


Abbildung 5: Darstellung der zur Klonierung des CEV verwendeten Primer und ihre Bindungsstellen an der Viroid RNA bzw ihrer cDNA

Die durchgezogene Linie repräsentiert die CEV RNA. Die für die Primerbindung wesentlichen Nukleotide sind einzeln aufgeführt. Zur Orientierung sind die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme BamH1 und Hind3 durch Kästchen eingezeichnet.

Die reverse Transkription der "linken Hälfte" des CEV mit dem Primer P15a, der rechts von der BamH1 Stelle bindet, muß man sich im Diagramm entgegen dem Uhrzeigersinn (in 5'-3' Richtung) vorstellen. Als Primer für die Synthese des zweiten Stranges wird PHR16 verwendet, dessen Lage und Sequenz auf dem Viroidstrang durch Großbuchstaben gezeigt ist. Er überstreicht die Hind3 Stelle. Die cDNA Synthese erfolgt diesmal im Uhrzeigersinn.

2) Die Synthese einer ds DNA, welche die "rechte Hälfte" des CEV Moleküls enthält erfolgt in analoger Weise mit den Primern PHH16 (Hind3 Stelle) und PBR16 (BamH1 Stelle).

4.1.2. Analytischer Ansatz

Zur Synthese der CEV cDNA wurden zunächst die Primer P15a und PHH16 mit ^{32}P endmarkiert. Nach der Synthese der cDNA mit reverser Transkriptase wurde die RNA- Matritze mit NaOH abgebaut. Die Analyse der hierbei entstandenen Reaktionsprodukte erfolgte auf einem Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen. Hierbei zeigte sich, daß bei beiden Synthesen genügend Transkripte mit einer Länge von über 200 Nukleotiden entstanden waren.

Die Synthese des zweiten Stranges geschah mit Hilfe des Klenow- Enzyms und der spezifischen "Rück-Primer" PBR16 und PHR16. Hier wurde durch die Verwendung von alpha- ^{32}P -dCTP das Ergebnis der Reaktion verfolgt. Anschließend wurden die nun doppelsträngigen DNAs mit BamH1 und Hind3 verdaut und über ein Polyacrylamidgel gereinigt. Die aus der reversen Transkription noch enthaltene Endmarkierung wurde damit gleichzeitig entfernt. In Abb. 6 ist ersichtlich, daß diesmal tatsächlich ds DNA entstanden war, die ungefähr der erwarteten Länge (197 Bp für die rechte Hälfte bzw. 174 Bp für die linke Hälfte) entsprach.

4.1.3. Präparativer Ansatz

Nachdem die Vorversuche positiv verlaufen waren, wurden die eingesetzten Mengen in einem nun folgenden präparativen Ansatz (ohne radioaktive Markierung) entsprechend gesteigert. Die nach dem Verdau der doppelsträngigen DNA mit BamH1 und Hind3 entstandenen Fragmente wurden durch Anfärbung mit Ethidiumbromid im Gel lokalisiert. Sie wurden ausgeschnitten und über Isotachophorese eluiert.

Im letzten Schritt wurden die so erhaltenen Fragmente in den Vektor pUC8 einkloniert, der zuvor mit den Enzymen BamH1 und Hind3 quantitativ gespalten wurde.

4.1.4. Restriktionsanalyse der Teilkclone

Im Fall der "rechten" Viroidhälfte wurden 27 Klone und bei der "linken" Hälfte 45 Klone erhalten und in Kultur genommen.



Abbildung 6: Autoradiogramm der Doppelstrangsynthese von CEV-CG1- "Hälften"

Die obige Abbildung zeigt das Autoradiogramm eines 5 %igen Polacrylamidgeles, auf dem die radioaktiven Endprodukte der Synthese der ds DNA von "Hälften" des CEV-CG1 Genoms aufgetrennt wurden. Die Positionen der Längenmarker wurden von einem entsprechenden Autoradiogramm mit längerer Expositionszeit übertragen. Auf dem Gel wurden folgende Proben aufgetragen:

- I: ds DNA der "linken" CEV- Hälfte
- M 1: pBR322/Hae 3 Fragmente
- M 2: pBR322/Hinf 1 Fragmente
- II: ds DNA der "rechten" CEV- Hälfte

Die Analyse der Klone erfolgte zunächst im Quicktest, wobei alle erhaltenen Plasmide sich als etwas länger als das Ausgangsplasmid pUC8 erwiesen und somit inserthaltig schienen.

Eine nähere Analyse wurde mit Restriktionsverdaus durchgeführt. Alle Inserts ließen sich in einem Doppelverdaus mit BamHI und Hind3 herausschneiden und wiesen die erwartete Längen auf. Außerdem wurde bei 8 ausgewählten Plasmiden mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten, um die Anwesenheit von CEV-spezifischen Sequenzen nachzuweisen. Da die dabei entstandenen Bandenmuster mit den zuvor mit Hilfe eines Computerprogramms berechneten identisch waren, konnte davon ausgegangen werden, daß die Klonierung erfolgreich verlaufen war.

4.1.5. Konstruktion eines Klons mit vollständigem CEV- Genom

Von den erhaltenen Teilklonen wurde für jede pro Viroidhälfte ein Klon ausgewählt und im präparativen Maßstab daraus das entsprechende Plasmid isoliert. Nach Spaltung mit Hind3 und BamHI wurden die Inserts mittels FPLC von den Plasmidresten abgetrennt. Zur Konstruktion des vollständigen CEV- Genoms mußten die beiden Hälften in der richtigen Weise miteinander verbunden werden. Für die dazu notwendige Ligasereaktion wurde eine hohe Konzentration der Fragmente in einem geringen Volumen gewählt, um die intermolekulare Reaktion gegenüber der intramolekularen Reaktion zu begünstigen. Außerdem wurde die Reaktion nach 2 Minuten beendet, um zu verhindern, daß lange, aus vielen CEV-Einheiten bestehende konkatemere Stücke entstehen. Die Produkte des Reaktionsansatzes wurden auf einem 8 %igen Polyacrylamidgel zusammen mit einem Längenmarker aufgetrennt. Das Fragment mit einer Länge von ca. 370 Bp wurde ausgeschnitten und elektroeluiert. Zur Klonierung wurde das Plasmid pUC8 mit Hind3 linearisiert. Um zu vermeiden, daß bei der späteren Transformation durch religiertes Plasmid ein hoher Hintergrund an Klonen ohne Insert entsteht, wurde nach der Spaltung noch dephosphoryliert und die lineare Form des Plasmids über ein Agarosegel gereinigt. Die zur Ligation verwendete CEV-DNA bestand aus einem Gemisch von zwei Typen des vollständigen CEV-Genoms, so daß die Verknüpfung entweder über

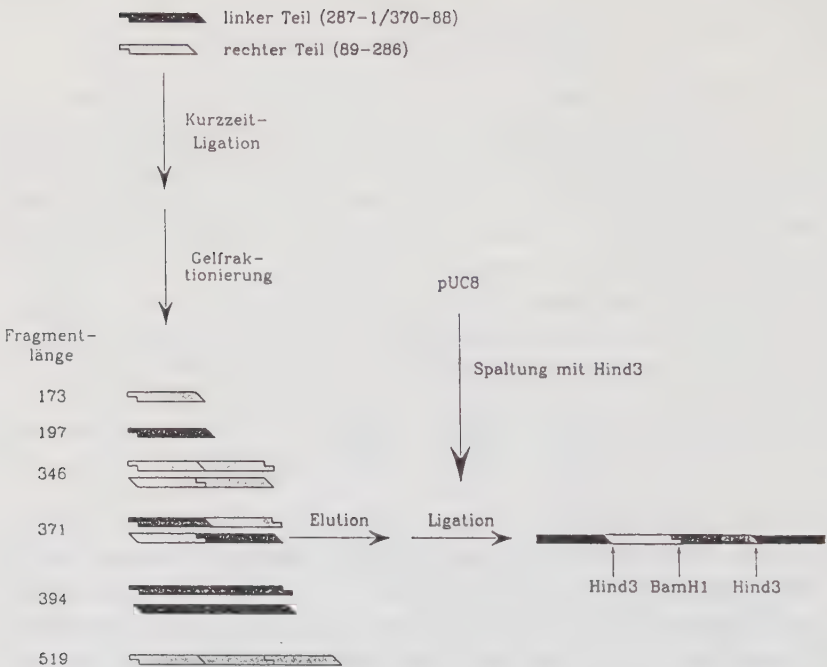


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Zusammensetzung von CEV-DNA aus der "linken" und "rechten" Hälfte.

Die beiden DNA Fragmente sind durch unterschiedlich schraffierte Teile dargestellt. Durch die schrägen bzw. gestuften Enden soll der palindromische Charakter der Hind3 bzw. BamH1 Erkennungsstellen symbolisiert werden.

Die nach kurzzeitiger Ligation entstandenen DNA Fragmente werden auf einem Gel getrennt. Die 371 Bp langen Fragmente werden aus dem Gel wiedergewonnen und zur Ligation in den mit Hind3 gespaltenen Vektor pUC 8 eingesetzt.

Dabei "passen" nur die Fragmente in den Vektor, die über ihre BamH1 Stelle verknüpft sind und deren Hind3 Enden nach außen weisen.

die Hind3- oder BamH1- Stelle erfolgen konnte. In den mit Hind3 geschnittenen Vektor "paßten" jedoch nur diejenigen Fragmente, die über ihre BamH1- Stelle zusammengesetzt waren. Nach der Transformation wurden zahlreiche Klone erhalten, die im Quicktest auf Insertgehalt untersucht wurden. Von 10 der hierbei positiven Klone wurden Restriktionsanalysen durchgeführt. Es zeigte sich, daß alle das gewünschte Insert enthielten. Das beschriebene Zusammensetzung der Teilkclone ist in Abb. 7 schematisch dargestellt.

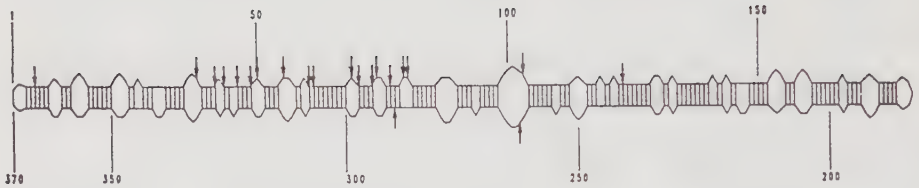
4.1.6. Sequenzierung nach Maxam-Gilbert

Von den erhalten Klone wurde wiederum einer zur näheren Analyse ausgewählt. Das enthaltene CEV- Insert wurde nach präparativer Isolation des Plasmids mit Hind3 herausgeschnitten und chromatographisch durch FPLC auf einer TSK 75 Säule vom Plasmidrest abgetrennt. Um zu überprüfen, ob es die korrekte Sequenz des CEV repräsentiert, wurde es nach der Methode von Maxam und Gilbert sequenziert.

Dazu wurde das Insert nach Dephosphorylierung mit ^{32}P an den Hind3-Enden markiert und anschließend mit dem Restriktionsenzym Sst2 in zwei ungleich lange Teile geschnitten. Die nun nur noch an einem Ende markierten Fragmente wurden auf einem Gel voneinander getrennt, eluiert und chemisch sequenziert.

Es zeigte sich, daß der erhaltene Klon, der den Namen CEV-KLON 1 erhielt, im Vergleich zum Ausgangsmaterial 22 Mutationen besaß und zudem um drei Nukleotide kürzer war. In Abb. 8 sind diese Mutationen schematisch am Modell des CEV-CG1 durch Pfeile dargestellt. Hier ist die Konzentration der Mutationsorte im oberen Teil des Viroidmoleküls im Bereich zwischen den Nukleotiden 40 und 80 besonders auffällig. In dieser Region wurde beim PSTV die Virulenz-modulierende (VM) Region lokalisiert (Schnölzer et al., 1985). Die nach Berücksichtigung dieser Mutationen sich ergebende Sekundärstruktur ist im unteren Teil der Abbildung gezeigt. Während im rechten Teil des Moleküls nur eine unwesentliche Änderung der Struktur zu verzeichnen ist, sieht das Bild auf der linken Seite völlig anders

A



B

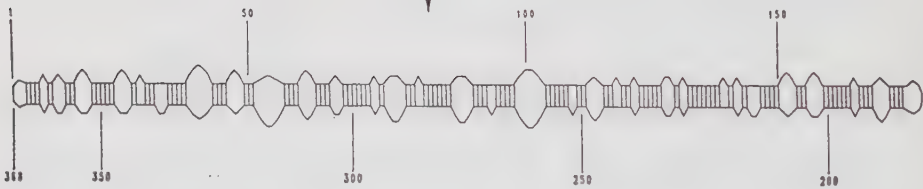


Abbildung 8: Mutationen und Sekundärstruktur der CEV-RNA, die sich aus dem CEV-KLON 1 ergibt

A) In der oberen Abbildung ist die Verteilung der Mutationen des CEV-Klons 1 in das Sekundärstrukturmodell der CEV-CG1 RNA eingezeichnet, wobei die Mutationsorte durch Pfeile gekennzeichnet sind.

B) Die Abbildung im unteren Teil zeigt die berechnete Sekundärstruktur der CEV RNA, wie sie sich nach Berücksichtigung der beim CEV-Klon 1 beobachteten Mutationen ergibt.

```

1  CGGGAACCTTTCTTGAGGTTCCTGTGGTGCTCACCTGA.CCTCCTGACAAG 49
   |||||
1  CGGGAUCUUUCUUGAGGUUCCUGUGGUGCACACUGACCUGCAGGCA.. 48
   |||||
50 AAAAGAAAAAAGAAGGCGGCTCGG..AGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGG 97
   |||||
49 GAAAGAGAAAAAGAGGCGGCGGGGGAAGAAGUCCUUCAGGGAUCCCCGGG 98
   |||||
98 GAAA.CTGGAGGAAGTCGAGGTC.GGGGGGACAGCTGCTTCGGTCGCCGC 145
   |||||
99 GAAACCUGGAGGAAGUCGAGGUCGGGGGGACAGCUGCUUCGGUCGCCGC 148
   |||||
146 GGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGAGCTCGTCTCCTTTCCTTCGC 195
   |||||
149 GGAUCACUGGCGUCCAGCGGAGAAACAGGAGCUCGUCUCCUUCUUCG 198
   |||||
196 TGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGTGAAGCGCCTCGCCCCCTCGCCCG 245
   |||||
199 UGCUGGCUCCACAUCCGAUCGUCGUGAAGCGCCUCGCCCCUCGCCCG 248
   |||||
246 AGCTTCTCTCTGGAGACTACCCGGTGGATACAACCTGAAGCTTTCAACCCC 295
   |||||
249 AGCUUCUCUCUGGAUACUACCCGGUGGAUACAACUGAAGC.UUCAACCCC 297
   |||||
296 AAGCCGCTTTTCTTATGTCTTCACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCC 345
   |||||
298 AAGCCGCUUUUCUUAUGUCUUCACUGCUCUCCGGGCGAGGGUGAAAGCCC 347
   |||||
346 TTGGAACCCCTAGATTGGGTCCT 368
   |||||
348 UUGGAACCCUAGAUUGGGUCCCU 370

```

Abbildung 9: Vergleich der Primärstrukturen von CEV-CG1 und CEV-KLON1

Der Sequenzvergleich der CEV-DNA des Klons CEV-KLON1 (obere Reihe) mit der Mastersequenz des CEV-CG1 (untere Reihe) wurde mittels eines Rechenprogramms erstellt. Die 22 Abweichungen im Klon 1 kommen durch Deletionen, Insertionen und Nukleotidaustausche zustande.

aus, denn die Größe und die Verteilung der "Loops" unterscheidet sich wesentlich von der im Sekundärstruktur-Modell des CEV-CG1.

In Abb. 9 sind die gefundenen Unterschiede im einzelnen aufgeführt. Die beiden Sequenzen beginnen jeweils mit dem Nukleotid 1 gemäß der in Abb. 1 gezeigten Numerierung. Als Mutationsart überwiegen Nukleotidaustausche an 13 Positionen; es wurden allerdings auch 3 Insertionen und 5 Deletionen gefunden.

Obwohl aufgrund dieser vielen Mutationen nicht zu erwarten war, daß diese CEV- Variante in der Lage ist, eine Infektion zu induzieren, sollte ein Klon erzeugt werden, in dem zwei Einheiten des monomeren Hind3- Inserts in Kopf-Schwanz- Orientierung miteinander verknüpft sind. Eine solche Dimerisierung ist deshalb notwendig, weil bisher nicht bekannt ist, an welchem Nukleotid oligomere Viroid (+) RNA, die bei der Replikation von Viroiden als Vorläufer der zirkulären Viroidmoleküle entsteht, in der Pflanze gespalten und anschließend zirkularisiert wird. Wenn allerdings mindestens zwei kovalent miteinander verknüpfte CEV- DNA-Monomere im Klon enthalten sind, so ist es in vivo jedenfalls potentiell möglich, daß daraus einmal die "richtige" monomere Viroid RNA herausgeschnitten und zirkularisiert werden kann.

Zur Dimerisierung wurden CEV-DNA Monomere ligiert und in einem mit Hind3 gespaltenen und dephosphorylierten Vektor inkloniert. Die dabei entstandenen Klone wurden im Schnelltest auf ihre Länge untersucht. Dabei zeigte sich, daß Plasmide entstanden waren, die 2 bis maximal 6 miteinander verknüpfte CEV-DNA-Monomere enthielten. Die Analyse der Orientierung ihrer Verknüpfung erfolgte durch Spaltung mit dem Enzym SstI. Diejenigen Plasmide, die nach Auftrennung auf einem Agarosegel eine Bande bei 370 Bp aufwiesen und in denen eine dimere CEV-DNA-Einheit enthalten war, trugen das gewünschte Insert. Eine genauere Analyse wurde durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen BamHI, SmaI, Hind3 und Ava2 durchgeführt, denn diese Enzyme schneiden innerhalb des CEV- Genoms nur einmal. Im Fall

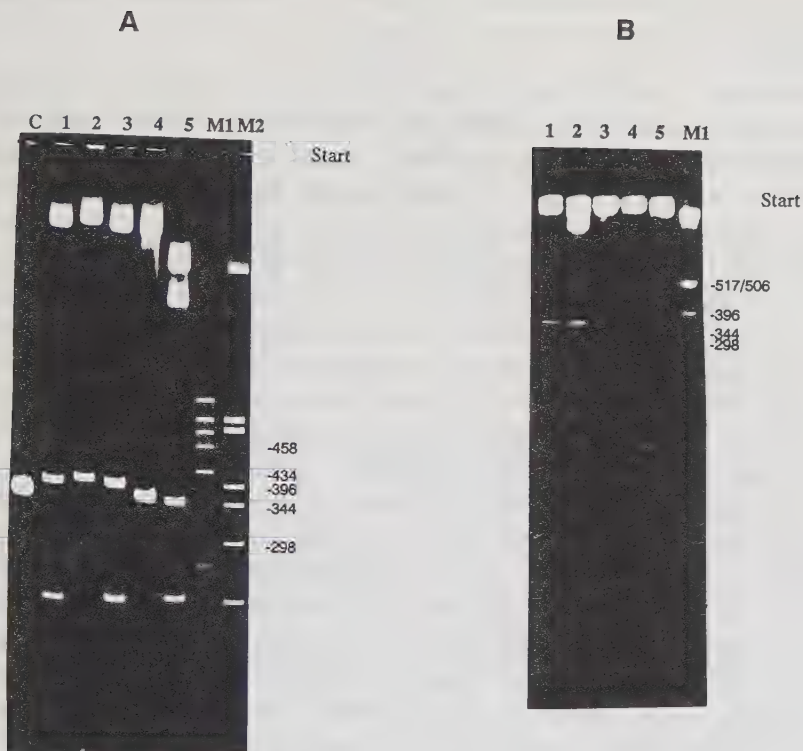


Abbildung 10: Restriktionsanalyse des Klon CEVKLON 1/D

A) Auftrennung der bei den Restriktionsverdaus erhaltenen Nukleinsäurefragmente auf einem 5 %igen Polyacrylamidgel.

Die für die Analyse wichtigsten Längen der Marker-DNA sind neben dem Foto angegeben.

B) Auftrennung derselben Nukleinsäurefragmente auf einem 2.5 %igen Agarosegel.

In den beiden Abbildungen enthalten die einzelnen Bahnen folgende Komponenten:

- C: CEV-DNA mit Hind3- Enden, 370 bp Länge als Referenz
- 1: CEVKLON1/D, geschnitten mit Sma 1
- 2: CEVKLON1/D, geschnitten mit Sst 1
- 3: CEVKLON1/D, geschnitten mit BamH 1
- 4: CEVKLON1/D, geschnitten mit Hind 3
- 5: CEVKLON1/D, geschnitten mit Ava 2
- M1: pBR322, geschnitten mit Hae 3
- M2: pBR322, geschnitten mit Hinf 1

einer Kopf/Schwanz-Verknüpfung sollte neben anderen auch ein Fragment der Länge um 370 Bp entstehen.

In Abb. 10 ist das Ergebnis dieser Restriktionsverdaus dargestellt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte zunächst auf einem 5 %igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen. Es zeigte sich, daß die Fragmente in der Länge unterschiedlich waren. Anhand der aufgetragenen Marker konnte der Längenbereich auf 340 - 410 Bp geschätzt werden. Erwartet wurde hingegen eine einheitliche Länge von ca. 370 Bp. Die beobachteten Abweichungen im Laufverhalten können ihre Ursache darin haben, daß je nach verwendetem Restriktionsenzym die Basenkompositionen der DNA-Fragmente verschieden sind und sich dann unterschiedlich starke elektrische Wechselwirkungen mit der Matrix des Polyacrylamids ergeben (Grierson, 1982; Anderson, 1986). Bei Agarosegelen tritt dieser Effekt nicht auf, so daß es für genaue Längenbestimmungen sinnvoller ist, dieses Gelsystem zu wählen. Wie im rechten Teil der Abb. 10 zu erkennen ist, konnte bei der Auftrennung des gleichen Fragmentgemisches in einem 2.5%igen Agarosegel keine Anomalie im Laufverhalten mehr beobachtet werden: alle Fragmente befinden sich gemäß der Vorhersage auf der gleichen Höhe. Somit enthielt der untersuchte Klon doch eine dimere CEV-DNA-Einheit in Kopf/Schwanz-Verknüpfung, die für die weiteren Experimente geeignet erschien.

4.1.7. Umklonierung in SP6- Vektoren

Um für den später notwendigen Nachweis von CEV in Pflanzen eine hochspezifische Hybridisierungsprobe zu erzeugen, wurde Weise eine dimere CEV-DNA-Einheit in den Vektor pSP64 bzw. dessen Analogon mit umgekehrtem Polylinker, pSP65 umkloniert. Dazu wurde das Insert mit den Enzymen EcoRI und Sall herausgeschnitten und in die mit den gleichen Enzymen linearisierten Plasmide eingesetzt. Beide Enzyme besitzen keine Erkennungssequenz innerhalb der CEV-DNA, wohl aber im Polylinker der Plasmide pUC8 und pSP. Die Synthese der CEV-spezifischen Transkript-RNAs mit Hilfe der SP6 RNA Polymerase erfolgte wie bei Tabler (1985) beschrieben.

4.1.8. Infektiositäts-Versuche mit Pflanzen

Zum Nachweis der Infektiosität der konstruierten CEV-Klone wurde die Komposite *Gynura aurantiaca* und die Buschtomatensorte "Rentita" ausgewählt, von denen bekannt ist, daß sie im Falle einer erfolgreichen Infektion mit deutlichen Symptomen reagieren (Dickson et al., 1978).

Für den Infektiositätstest wurden je 10 Pflanzen beider Arten mit 1 µg folgender Proben inokuliert:

- monomere CEV-DNA
- dimere CEV-DNA
- monomere CEV (+) und (-) Transkript-RNA
- dimere CEV (+) und (-) Transkript-RNA
- Natürliche PSTV-KF440 RNA als Positiv-Kontrolle (je 10 ng/Pflanze)
- Natürliche CEV-SP1 RNA als Positiv-Kontrolle (je 10 ng/Pflanze)
- Inokulationspuffer alleine als Negativ-Kontrolle

Die PSTV Positiv-Kontrolle zeigte auf Tomate bereits nach 3 Wochen typische Symptome in Form von Blatträuslung, Epinastie und Triebstauchung, während im Fall der CEV Positiv-Kontrolle erst nach 5-6 Wochen Anzeichen einer Infektion erkennbar waren. Bei allen mit Hilfe der molekularen Klonierung hergestellten CEV-Konstrukten konnten auch nach dem Zurückschneiden der Pflanzen bei den dann neu austreibenden Seitensprossen keine Symptome beobachtet werden.

Um auszuschließen, daß es sich bei den Konstrukten des CEV um Varianten handelte, die zwar keine Symptome verursachen, aber dennoch zur Replikation fähig sind (siehe Sänger, 1984), wurden von allen infizierten Pflanzen Blattproben entnommen und im Northern Blot mittels molekularer Hybridisierung auf Viroidgehalt untersucht. Als Hybridisierungsprobe diente dazu

eine Transkript-RNA mit zur CEV- RNA entgegengesetzten Polarität.

Die Hybridisierung wurde bei 65°C vorgenommen, da unter diesen wenig stringenten Bedingungen auch das PSTV mit der CEV- Probe hybridisiert (Herold, 1986). In den Nukleinsäure-Extrakten aus Pflanzen, die mit den natürlichen Viroiden inokuliert worden waren und die auch deutliche Krankheitssymptome zeigten, waren Viroid-spezifische Hybridisierungs-Signale zu erkennen. In den entsprechenden Proben aus den Pflanzen, die mit klonierter CEV-DNA oder -RNA inokuliert worden waren, konnten jedoch keine CEV- spezifischen Sequenzen nachgewiesen werden. Damit erwies sich der benutzte CEV- Klon tatsächlich als nicht infektiös.

4.2. Sequenzierung der Teilkclone

Nachdem offensichtlich war, daß der zusammengesetzte CEV-KLON 1 nicht infektiös war, sollte aus den erhaltenen übrigen Teilklonen diejenigen Hälften herausgesucht werden, die im Vergleich zur Sequenz des CEV-CG1 keine Veränderungen aufwiesen. Man kann nämlich davon ausgehen, daß ein Konstrukt, das aus solchen Hälften zusammengesetzt wird, infektiös sein dürfte. Daher mußten alle 75 Klone sequenziert werden. Damit kann gleichzeitig die Häufigkeit und Verteilung von Mutationen in der CEV-Probe ermittelt werden, die zur Klonierung verwendet wurde.

4.2.1. Auswahl der Sequenzierungs-Methode

Da es sich um die Sequenzierung von insgesamt etwa 75 Plasmiden handelte, mußte dafür eine Methode gewählt werden, mit

der in vertretbarem Zeitaufwand die Sequenzen der Inserts dieser Teilklone bestimmt werden konnten. Die genauere Situation im Plasmid verdeutlicht *Abb. 11*.



Abbildung 11: Schematische Darstellung der Umgebung der ds CEV cDNA in den zu sequenzierenden Teilklonen

Die Positionen der Erkennungssequenzen von BamHI, HindIII und EcoRI sind durch Pfeile symbolisiert. Auf den flankierenden Vektorsequenzen des Inserts befindet sich Bindungsstellen für die zur Sequenzierung eingesetzten Primer. So kann die Nukleotidabfolge beider Stränge der insertierten CEV DNA bestimmt werden. Die dabei erhaltenen komplementären Sequenzen können anschließend zur Kontrolle miteinander verglichen werden.

a) Die Sequenzierung nach Maxam-Gilbert (1977) erfordert zunächst eine möglichst vollständige Endmarkierung der betreffenden DNA. Dazu muß das Plasmid mit einem Restriktionsenzym außerhalb des Inserts linearisiert werden, anschließend dephosphoryliert und dann mit ^{32}P radioaktiv markiert werden. In einem weiteren Arbeitsgang muß schließlich die Markierung abgespalten werden, die sich an dem Ende des Plasmides befindet, das dem Insert abgewandt ist.

Eine alternative Markierungsart bedient sich des Klenow-Enzyms und alpha- ^{32}P -Deoxynukleotiden, die nach Spaltung mit

BamHI zur Auffüllung der zurückgesetzten 5'-Enden benötigt werden.

Der Nachteil beider Methoden besteht darin, daß die gewählte Markierungsart nicht sehr effizient ist und daß die Sequenzierung außerdem relativ zeitraubend ist. Der Vorteil dieser chemischen Sequenzierung liegt allerdings darin, daß bei ihr im Gegensatz zur enzymatischen Methode keine Sequenzunsicherheiten auftreten.

b) Eine Methode, die auf einem völlig anderen Prinzip beruht, ist die enzymatische Sequenzierung (Sanger und Coulson, 1977). Sie wurde ursprünglich für die Sequenzbestimmung von einzelsträngiger Phagen-DNA entwickelt. Nach einer Abwandlung von Chen und Seeburg (1985) ist sie auch für die Sequenzierung von doppelsträngigen Plasmiden geeignet.

Hierbei können die Plasmide in ihrer "supercoiled"-Form enzymatisch mit zwei Primern sequenziert werden, deren Bindungsstellen jeweils auf entgegengesetzten Seiten des Polylinkers und damit auch des Inserts lokalisiert sind.

Diese Methode hat den Vorteil, daß sie nur einen geringen Zeitaufwand erfordert und daß aufgrund der bei der Polymerase-Reaktion eingesetzten alpha-³²P-Deoxynukleotide der Markierungsgrad der synthetisierten DNA sehr hoch ist. Daher benötigt man zur Exposition der Sequenzgele relativ kurze Zeiten und selten länger als einem Tag.

Da für die Anwendung der Methode von Chen und Seeburg (1985) die Reinheit der zu sequenzierenden Plasmide von entscheidender Bedeutung ist, wurden zunächst Vorversuche unternommen, in denen die Eignung unterschiedlicher Plasmidaufbereitungen ermittelt wurde. Im einzelnen wurden die Methoden von Birnboim und Doly (1979), Holmes und Quigley (1981) sowie Priefer (1984) ausgewählt. Dabei erwies sich eine Modifikation der Methode von Birnboim und Doly als am besten geeignet, obwohl sie erheblich niedrigere Plasmidausbeuten lieferte als die beiden anderen Methoden.

Da die Viroid-RNA einen hohen Grad intramolekularer Basenpaarung aufweist, ist für die Viroid-DNA im Plasmid ein ähnliches Verhalten zu erwarten. Diese strukturelle Eigentümlichkeit könnte während der Sequenzierungsreaktion zu unerwünschten zusätzlichen Kettenabbrüchen führen, welche dann die durch die Dideoxynukleotide hervorgerufenen Abbrüche überlagern. Die daraus resultierenden komplexen Bandenmuster auf den Sequenzgelen wären dann unter Umständen schwer zu interpretieren.

Erfreulicherweise trat jedoch ein solcher Effekt nicht auf, so daß mit dieser Methode die Sequenzen der CEV-Inserts von beiden Seiten her vollständig gelesen werden konnten. Da auch die jeweils komplementären Stränge sequenziert wurden, ließen sich die Sequenzen der insertierten Viroid- Teilbereiche zweifelsfrei ermitteln.

4.2.2. Bestimmung der Mutationsverteilung beim CEV

Unter der Voraussetzung, daß das CEV-CG1 eine Mischpopulation von von zueinander sehr ähnlichen RNA-Molekülen darstellte, war zu erwarten, daß die daraus erhaltenen CEV-Teilklone im Vergleich zur bereits früher ermittelten Mastersequenz (Haas et al., unpubliziert) an unterschiedlichen Stellen Mutationen trugen. Außerdem sollten bestimmte Mutationen in unterschiedlicher Häufigkeit in dieser Population enthalten sein. Der Ort, die Art, der Typ und die Häufigkeit der Mutationen, die mit Hilfe dieser Sequenzierung gefunden wurden, sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Daraus können folgende Aussagen gewonnen werden:

a) Die RNA der Sequenz-Variante CEV-CG1 ist ohne Mutation 370 Nukleotide lang. Infolge der Sequenzvariation des CEV konnte die Länge der RNA über die Sequenzierung der auch zur Klonierung verwendeten cDNA dieses Viroids nicht exakt ermittelt werden.

b) Von den sequenzierten 72 Inserts tragen insgesamt 15 keine Mutationen und 29 jeweils nur eine einzige Mutation. Von den 45 Klonen, welche die linke Hälfte des CEV enthalten, tra-

Tabelle 2: Häufigkeit und Verteilung der Mutationen in der Population der sequenzierten CEV-Teilkclone

a) Linke Hälfte (288 -370/1- 87)

Bezeichnung des Teilkklons	- ort	Mutations- art	typ	Häufigkeit
CEVSP1-L0		keine		8
CEVSP1-L1	315:	G->A	A	9
CEVSP1-L2	70:	G->A	A	4
CEVSP1-L3	300:	A->T	A	1
CEVSP1-L4	49:	G->A	A	1
CEVSP1-L5	319:	-U	D	1
CEVSP1-L6	53:	G->A	A	
	70:	G->A	A	5
CEVSP1-L7	49:	G->A	A	
	53:	G->A	A	
	70:	G->A	A	1
CEVSP1-L8	6:	U->A	A	
	53:	G->A	A	
	70:	G->A	A	4
CEVSP1-L9	53:	G->A	A	
	70:	G->A	A	
	350:	U->C	A	1
CEVSP1-L10	6:	U->A	A	
	53:	G->A	A	
	70:	G->A	A	
	300:	A->G	A	2
CEVSP1-L11	6:	U->A	A	
	53:	G->A	A	
	70:	G->A	A	
	33/34:	+C	I	1
CEVSP1-L12	6:	U->A	A	
	53:	G->A	A	
	70:	G->A	A	
	55/56:	+G	I	1
CEVSP1-L13	53:	G->A	A	
	70:	G->A	A	
	327/328:	+C	I	1
CEVSP1-L14	315:	G->A	A	
	10/70:	+A	I	1
CEVSP1-L15	315:	G->A	A	
	6/7:	+A	I	
	53:	G->A	A	
	10/70:	+G	I	1

Bezeichnung des Teilkklons	- ort	Mutations- art	typ	Häufigkeit
CEVSP1-L16	53:	G->A	A	
	70:	G->A	A	
	349:	-U	D	1
CEVSP1-L17	2:	-G	D	
	6:	U->A	A	
	53:	G->A	A	
	70:	G->A	A	
	295:	-C	D	
	322/323:	+G	I	1
CEVSP1-L18	6:	U->A	A	
	53:	G->A	A	
	70:	G->A	A	
	300:	A->T	A	1

b) rechte Hälfte (89 - 287)

CEVSP1-R0		keine		7
CEVSP1-R1	130:	A->G	A	1
CEVSP1-R2	278:	U->A	A	4
CEVSP1-R3	98:	G->C	A	1
CEVSP1-R4	161:	G->C	A	1
CEVSP1-R5	265/266:	+G	I	1
CEVSP1-R6	268	-C	D	5
CEVSP1-R7	98:	G->C	A	
	120:	G->C	A	1
CEVSP1-R8	123:	-G	D	
	145:	G->C	A	1
CEVSP1-R9	265/266:	+G	I	
	122/123:	+G	I	4
CEVSP1-R10	265/266:	+G	I	
	117:	-G	D	1

gen 8 Klone keine Mutation. Es wurden jedoch 9 Klone gefunden, die eine Mutation bei Pos. 315 tragen, die somit häufiger vorkommt als man aus der Sequenz des CEV-CG1 annehmen kann.

c) Während einige Mutationen nur einmal vorkommen, gibt es auch solche, die wesentlich häufiger auftreten. So findet man z.B. Mutationen in Position 6 elfmal, in Pos. 53 zwanzigmal, in Pos. 70 23mal und in Pos. 315 elfmal.

d) Die relative Verteilung und die Häufigkeit aller ermittelten Mutationen auf dem CEV- Molekül ist in Abb. 12 dargestellt. Besonders erwähnenswert ist, daß zahlenmäßig der größte Teil der Mutationen (66 von 101) sowie die bereits erwähnten häufigsten Mutationen innerhalb eines Bereiches liegen, der in etwa beim PSTV der sog. "Virulenz-modulierenden (VM)-Region entspricht (Schnölzer et al., 1985) und der durch gestrichelte Linien angedeutet. Eine vergleichbare Mutationsverteilung wurde bereits bei der Sequenzierung des Klons CEV-KLON 1 beobachtet (vgl. Abb. 8).

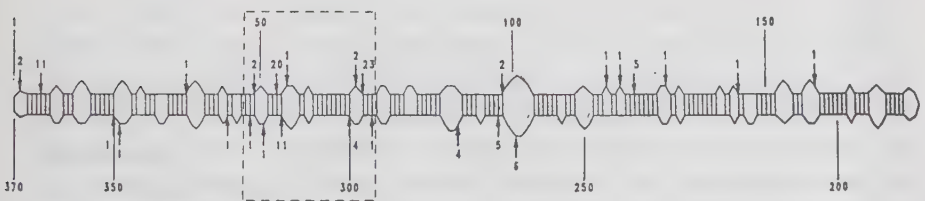


Abbildung 12: Verteilung und Häufigkeit von Mutationen innerhalb des CEV-Isolats CG1

Die Verteilung der bei der Sequenzierung der Teilkclone gefundenen Mutationen ist am Sekundärstrukturmodell des CEV-CG1 dargestellt. Die Zahlen über den Pfeilen geben die Häufigkeit der jeweiligen Mutation an.

Der gestrichelt eingerahmte Teil stellt den Molekül-Bereich mit den meisten Mutationen dar.

e) Etwa 70 % aller beobachteten Mutationen werden durch Basenaustausche hervorgerufen, während 18 % auf Insertionen und 12 % auf Deletionen beruhen. Außerdem zeigt sich, daß die meisten Mutationen innerhalb eines Loops oder unmittelbar dazu benachbart auftreten. Dies ist insofern einleuchtend, da diese Bereiche im Rahmen der zu einem hohen Grad basengepaarten Sekundärstruktur am flexibelsten sind.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann leider keine Aussage darüber gemacht werden, wie die Mutationshäufigkeit innerhalb eines ganzen CEV- Moleküls ausgeprägt ist. Da das CEV nicht in einem Stück kloniert, sondern aus zwei unabhängig voneinander klonierten Hälften zusammengesetzt wurde, kann nämlich nicht ausgeschlossen werden, daß sich einzelne Mutationen, z.B. über die Längenveränderung des Moleküls, gegenseitig beeinflussen.

4.3. Konstruktion von CEV - Monomeren im Plasmid Bluescribe

Aus den sequenzierten Teilklonen sollten nun neben der Herstellung eines CEV- Klonen mit der Sequenz des CEV-CG1 verschiedene CEV- Mutanten zusammengesetzt werden.

4.3.1. Auswahl der Klonierungs-Stelle im Plasmid

Es war bekannt, daß monomere CEV- Einheiten, die in die BamHI- Stelle von pSP64 eingesetzt werden, infektiös sind (Visvader und Symons, 1985). Ein ähnliches Verhalten konnte auch im Fall von PSTV beobachtet werden (Tabler und Sänger, 1984). In diesem Fall war die monomere PSTV- Einheit ebenso wie beim CEV in den Vektor M13mpl1 inseriert. Die Vektor-DNA mit der monomeren PSTV-Einheit erwies sich in ihrer Infektiosität allerdings als deutlich schwächer als diejenige, die in der BamHI- Schnittstelle die analoge, dimere BamHI- Einheit enthielt.

Bei genauer Betrachtung der Nukleotidsequenz, die im Polylinkers dieser Plasmide an die eingesetzte ds cDNA von cev oder PSTV angrenzt, fällt auf, daß hier zufällig ein Sequenzmotiv wiederholt ist, welches auch in dem zentral konservierten Bereich der Viroids enthalten war. Nach dem Einklonieren der monomeren Viroid-Einheit in die BamHI-Stelle wurden so ein

DNA-Segment erhalten, in dem insgesamt 11 Nukleotide des Viroidgenoms dupliziert sind. Somit ist die im Plasmid enthaltene "Viroidsequenz" länger als die eines "echten" Monomeren, wie es zum Beispiel nach Einklonierung in die Hind3 Stelle der Fall ist. Dies traf allerdings nur dann zu, wenn die Viroid-DNA in (+) Orientierung im Vektor angeordnet war. In *Abb. 13* ist diese Situation für das CEV dargestellt.

.....agagGATCCCCGGGGAA.....CEV-Sequenz.....AGGgatccccgggc

^ Repeat ^

Abbildung 13: Duplikation eines 11 Nukleotide langen Viroid-spezifischen Sequenz-Abschnitts durch Einklonieren monomerer Viroid cDNA in die BamHI Stelle des Plasmids M13mp11. Die Nukleotide der CEV-DNA sind in Großbuchstaben, die des Plasmids in kleinen Buchstaben gekennzeichnet. Das wiederholte Sequenzmotiv durch Einrahmung hervorgehoben.

Aufgrund von Infektions-Versuchen von Visvader (1986), in denen Pflanzen mit CEV-Konstrukten inokuliert wurden, die in der zentral konservierten Region künstlich gesetzte Mutationen enthielten, und von in-vitro Prozessierungs-Experimenten (Tsagris et al., 1987) kann vermutet werden, daß sich innerhalb dieses Repeats möglicherweise die Prozessierungsstelle zur Zirkularisierung des Viroids befindet. Man kann sich nämlich vorstellen, daß nach der Inokulation mit Transkript-RNA, die diesen Bereich zweimal enthält, vollständige zirkuläre Viroid-Moleküle entstehen können, die in der Lage sind, die Replikation zu initiieren und somit zur Infektion zu führen.

Unter Berücksichtigung dieser Erfahrungen sollten diesmal entsprechende Teilkclone in der BamHI- Stelle eines geeigneten Vektors zu einer CEV cDNA voller Länge zusammengesetzt werden,

damit auch hier durch die Wiederholung von Teilen der zentral konservierten Region des Viroids auf 11 Bp Länge innerhalb seines Polylinkers eine Sequenz entsteht, die unter Umständen in der Lage ist, auf den verwendeten Testpflanzen CEV-spezifische Symptome zu induzieren.

4.3.2. Klonierungsschema und Kriterien zur Neu-Konstruktion von CEV- Mutanten

Inzwischen war das im Methodenteil beschriebene Plasmid "Bluescribe" kommerziell erhältlich. Dieses trägt den für die Sequenzduplikation benötigten Polylinker von pUC19 und zusätzlich noch je einen Promotor für RNA- Polymerasen auf beiden Seiten des Polylinkers, so daß die Sequenz eines hier eingesetzten Inserts von beiden Seiten transkribiert werden kann. Auf diese Weise kann man Transkripte entgegengesetzter Polarität erzeugen, ohne das Insert umklonieren zu müssen.

Das Schema der Klonierung und die anschließende Position des Inserts im Vektor sind in *Abb. 14* dargestellt. Es wurden insgesamt 20 CEV- Klone mit Mutationen nach folgenden Kriterien zusammengesetzt:

a) Erzeugung eines Klones ohne Mutationen.

b) Erzeugung von Klonen mit nur einer Mutation jeweils in und außerhalb der "VM"- Region. Hierbei sollten sowohl häufig vorkommende als auch weniger oft vertretene Mutationen gewählt werden.

c) Konstruktion von Klonen mit mehreren Mutationen, bei denen eine Viroidhälfte jeweils frei von Mutationen sein sollte. Wenn also eine Mutante verwendet wurde, die in der rechten Hälfte Mutationen trug, sollte die entsprechende linke Hälfte die Originalsequenz enthalten und umgekehrt.

Für die Konstruktion der neuen CEV Klone wurden die Inserts derjenigen Teilklone, die keine Mutationen aufwiesen, in größeren Mengen benötigt. Dazu wurden sie in präparativem Maßstab isoliert und über FPLC gereinigt. Zur Isolierung von Inserts, die Mutationen trugen, genügten kleinere Mengen, so daß

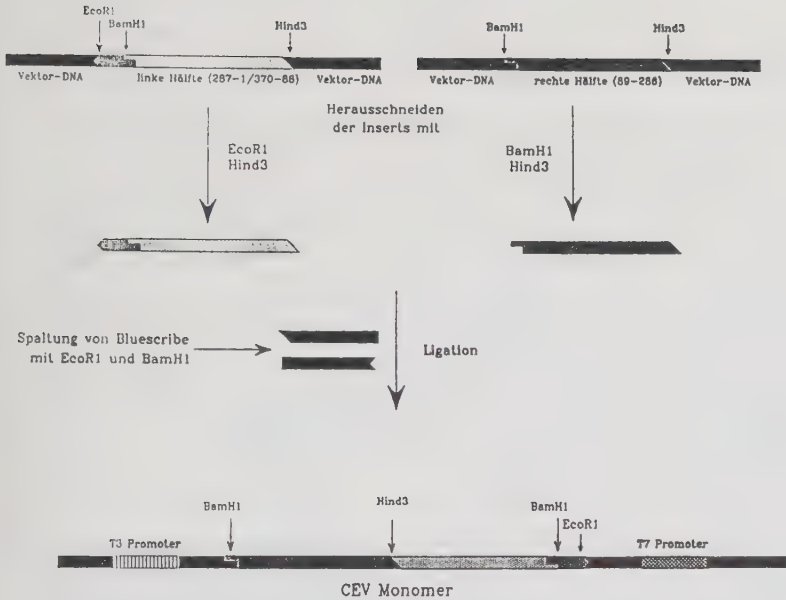


Abbildung 14: Klonierungsschema für die Zusammensetzung von CEV-CG1 Mutanten im Vektor Bluescribe

Im oberen Teil der Abbildung ist die Ausgangslage zur Subklonierung der CEV Teilfragmente verdeutlicht. Die schattierten Bereiche repräsentieren die CEV DNA, die sich zwischen den Erkennungsstellen von BamHI und Hind3 im Vektor pUC 8 (schwarz) befindet. Zusätzlich ist die EcoRI Erkennungsstelle im Polylinker des pUC 8 eingezeichnet.

Die CEV-DNA wird mit den angegebenen Restriktionsenzymen herausgeschnitten und im nächsten Schritt mit einem durch EcoRI und BamHI linearisierten Bluescribe-Vektor ligiert.

Der Vektor kann nur geschlossen werden, wenn die beiden Viroidhälften in der unten dargestellten Konfiguration eingebaut werden.

eine Aufreinigung in analytischem Maßstab über Polyacrylamid-gele und anschließende Isotachophorese ausreichte.

Aus Klonen, welche die "linke Hälfte" des CEV enthielten, wurde das Insert mit EcoR1 und Hind3 herausgeschnitten. Klone, welche die "rechte Hälfte" enthielten, wurden mit BamH1 und Hind3 gespalten.

So erhaltene "Hälften" wurden anschließend zusammen mit einem Bluescribe-Vektor ligiert, der mit den Restriktionsenzymen EcoR1 und BamH1 linearisiert worden war. Diese Methode hatte den Vorteil, daß nur solche DNA-Fragmente in den Vektor "paßten", welche an einem Ende eine BamH1- und am anderen Ende eine EcoR1-Schnittstelle aufwiesen. Von den verschiedenen Monomeren-Fragmenten, die sich zumindest prinzipiell durch die zahlreichen Kombinationsmöglichkeiten während der Ligasereaktion ergeben konnten, erfüllt nur das korrekt über die Hind3-Stelle zusammengesetzte CEV-Monomere diese Bedingung.

4.3.3. Analyse der CEV- Mutanten

Die mit diesen Vektoren erhaltenen Klone wurden vorselektiert, indem die Plasmide mit den Enzymen BamH1 bzw. Sst2 verdaut wurden. Zur Erfolgskontrolle der Viroid-Neukonstruktion wurden die Klone, die das erwartete Restriktionsmuster lieferten, mit Hilfe der Plasmidsequenzierung analysiert. In einigen Fällen waren die dabei erhaltenen Sequenzgele sehr schlecht lesbar, da an verschiedenen Stellen innerhalb der CEV DNA Abbrüche während der Sequenzierungsreaktionen erfolgten und in den erhaltenen Bandenmustern in allen vier Spuren Banden auf gleicher Höhe auftraten. Dies ist insofern nicht verwunderlich, weil bei Klonen mit vollständigem Viroidgenom sowohl intra- als auch intermolekulare Basenpaarungen der CEV-DNA, die während der Sequenzierung einzelsträngig vorliegt, wahrscheinlicher sind als bei solchen, die nur eine Teilsequenz des Viroids enthalten.

Das Problem konnte auf zwei Wegen umgangen werden:

a) Statt des Klenow- Enzyms wurde für die Sequenzierungsreaktionen das Enzym reverse Transkriptase verwendet, das auch

Tabelle 3:

Zusammenstellung der konstruierten CEV-Mutanten und die Position der Mutationen
im Vergleich zum natürlichen CEV- Isolat CG1

Klon	Mutation(en) im Vergleich zu CEV-CG1	Klon	Mutation(en) im Vergleich zu CEV-CG1
(0)	keine	<u>b) Linke Hälfte : von 287 über 1/370 bis 88</u>	
<u>a) Rechte Hälfte : von 89 bis 286</u>		(9)	49:G->A
(1)	268:-C	(10)	70:G->A
(2)	123:-G	(11)	315:G->A
(3)	130:A->G	(12)	319:-C
(4)	161:G->C	(13)	53:G->A
(5)	117:-G	(14)	70:G->A
	265/6: + G		49:G->U
(6)	129/30: + G		53:G->A
	278:U->A		70:G->A
(7)	122/3: + G	(15)	6:U->A
	265/6: + G		53:G->A
(8)	wie (6), jedoch mit deletierter Hind3- Schnittstelle (268 - 292)		70:G->A
		(16)	2:-G
			6:U->A
			53:G->A
			70:G->A
			295:-C
			352/3: + G

DNA als Template akzeptiert. Dieses Enzym hat allerdings eine wesentlich größere Affinität zu Dideoxynukleotiden, so daß bei der Zusammensetzung der Sequenzierungs-"Mixe" deren Konzentrationen erheblich erniedrigt werden mußten. Nach erfolgter Sequenzierung waren auf den hierbei erhaltenen Sequenzgelen ähnliche Abbrüche zu erkennen, wie sie bereits bei Verwendung des Klenow-Fragments gefunden worden waren. Da diese jedoch an anderen Positionen lagen, konnte so die Sequenz mit Hilfe beider Enzyme zweifelsfrei bestimmt werden.

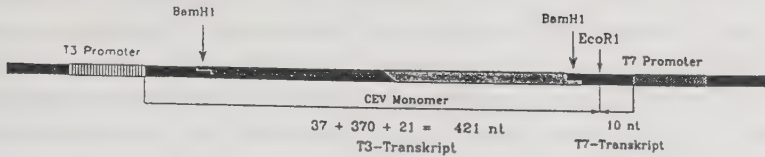
b) Aus den rekombinanten "Bluescribe"- Plasmiden wurde mittels eines Helferphagens der Einzelstrang gewonnen und mit dem Klenow-Fragment sequenziert. Die dabei entstandenen Bandenmuster waren zwar nur bis zu etwa 200 Nukleotiden lesbar, dafür aber eindeutig zu interpretieren.

Durch diese Re-Sequenzierung der zusammengesetzten CEV-Monomeren konnte außerdem deren Orientierung ermittelt werden, da bei dieser Klonierungsmethode das BamHI-Monomere prinzipiell in (+) und (-) Orientierungen in den Vektor eingesetzt sein konnte. Es zeigte sich dabei auch, daß nur noch 17 Klone die erwarteten Mutationen enthielten. Bei den übrigen 3 Klonen war wieder die Sequenz des CEV-CG 1 entstanden.

Tabelle 3 zeigt die Komposition der zusammengesetzten und sequenzierten CEV- Mutanten. Eine Besonderheit stellt hierbei Klon 8 dar, dem in der zentral konservierten Region 6 Nukleotide fehlen, die für die Hind3- Erkennungsstelle kodieren. Dies ist vermutlich auf einen Fehler beim Zusammensetzen der CEV-Teile zurückzuführen. Da manche käuflichen Präparationen von Restriktionsendonukleasen auch geringe Exonuklease-Aktivitäten enthalten, könnte es in diesem Fall zu einem Abbau der 3'-überstehenden Nukleotide gekommen sein. Die dabei entstandenen "blunt ends" sind dann ebenfalls geeignet, miteinander verbunden zu werden, so daß das betreffende Plasmid in der anschließenden Ligase-Reaktion geschlossen werden kann.

Mit diesen Klonen sollten nun Pflanzen inokuliert werden, um die Auswirkungen der Mutationen , die in den "künstlichen" Viroid-Genomen enthalten sind, auf Replikabilität und Sym-

a) Linearisierung mit EcoR1



b) Linearisierung mit Xba1

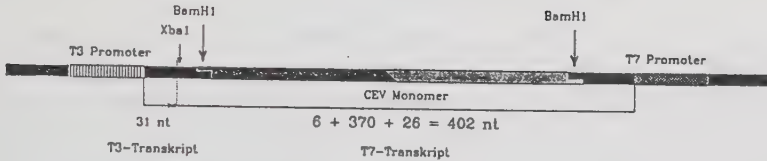


Abbildung 15: Diagramm der *in vitro* Transkriptionen von Klonen mit monomerer CEV-BamH1 Einheit

In beiden Teilen der Abbildung ist das aus zwei Teilen zusammengesetzte CEV Insert in der BamH1 Schnittstelle des Vektors Bluescribe dargestellt. An den flankierenden Bereichen des Inserts ist die Lage der Promotoren für die Phagenpolymerase T3 und T7 skizziert.

a) In der oberen Abbildung ist gezeigt, aus welchen Teilen das Transkript zusammengesetzt ist, das sich nach Linearisierung mit EcoR1 und Transkription mit T3 RNA Polymerase ergibt. Die Längen beträgt mit den angrenzenden Vektorsequenzen 421 Nukleotide.

b) Die untere Abbildung zeigt die Situation bei Linearisierung mit Xba1 und Transkription mit T7 RNA Polymerase. Das erhaltene Transkript ist hierbei nur 402 Nukleotide lang.

ptomausprägung zu untersuchen. Von PSTV war bekannt, daß zur Infektion von Pflanzen mit Transkript-RNAs nur etwa 1/1000 der Substanzmenge der korrespondierenden DNA- Form benötigt wurde (Tabler und Sänger, 1985). Wegen der beschränkten Kapazität des Gewächshauses sollte bei den anstehenden Infektionsversuchen die Testpflanzen nur mit der Transkript-RNA und nicht mit der DNA der Mutanten inokuliert werden. Diese Transkriptionen konnten nun mit dem nachfolgend beschriebenen T3/T7- System durchgeführt werden.

4.4. Synthese von CEV-spezifischer Transkript-RNA mit Hilfe der T3/T7- RNA Polymerase Systems

Die Transkription mit diesen Phagenpolymerasen unterscheidet sich nur geringfügig von der inzwischen gut untersuchten und häufig angewandten *in vitro* Transkription mit der SP6- RNA Polymerase. Die käuflichen Enzympreparationen der T3- und T7- RNA Polymerase sind allerdings aus kloniertem Material gewonnen und weisen wesentlich höhere spezifische Aktivitäten auf. Dadurch sind bei kürzeren Reaktionszeiten RNA-Synthesen mit höherer Ausbeute möglich.

In Abb. 15 ist die Strategie der Transkriptionen am Beispiel eines Klones mit monomerem CEV- Insert dargestellt. Je nach ermittelter Orientierung der Inserts im Vektor wurde entweder mit EcoR1 linearisiert und mit T3 RNA Polymerase transkribiert, oder es fand die T7 RNA Polymerase nach Linearisierung mit Xba1 Verwendung. Die so entstandenen Transkripte besaßen an beiden Enden noch Fremdsequenzen der mit-transkribierten Vektorteile. Nach Linearisierung des Plasmids mit EcoR1 entsteht durch die Transkription mit T3 RNA Polymerase RNA mit einer Länge von 421 Nukleotiden, während die dimere Einheit nochmals um 370 Nukleotide länger ist. Nach Linearisierung mit Xba 1 entsteht bei der Transkription mit T7- RNA Polymerase 402 und im Fall der dimeren Einheit 772 Nukleotide lange RNA.

4.5. Infektiositätstests mit CEV-CG1 auf Gynura und Tomate

Um zu überprüfen, ob der aus den beiden mutationsfreien CEV-CG 1 "Hälften" zusammengesetzte Klon CEV-(0) infektiös ist, wurden mit ihm je 10 Gynura- und Tomatenpflanzen inokuliert. Um eventuelle Unterschiede in der Infektiosität der monomeren und dimeren Einheit zu ermitteln, wurde das CEV-Monomere des Klons CEV-(0) dimerisiert. Als Positiv-Kontrolle wurden die natürlichen Viroide CEV-CG1 und PSTV-KF440 verwendet; als Negativ-Kontrolle diente der Inokulationspuffer alleine. Die Pflanzen wurden nach der Inokulation auf CEV-spezifische Symptome hin beobachtet und nach 4 Wochen im "Dot blot" auf Viroidgehalt untersucht. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 4 und Abb. 16 zusammengefaßt.

Es zeigte sich, daß Transkript-RNA, welche die monomere BamHI- Einheit enthielt, nur in ca. 30 % der inokulierten Pflanzen eine Infektion auslösen konnte. Die Inokulation mit dem entsprechenden dimeren Konstrukt führte ebenso wie die Inokulation mit den als Kontrollen verwendeten natürlichen Viroid-RNAs von PSTV und CEV innerhalb von drei Wochen zur Erkrankung inokulierter Pflanzen.

Da ebensoviel Tomaten wie Gynura erkrankten, eignen sich beide Pflanzen-Arten für diese Biotests gleichermaßen. Allerdings zeigte die Komposite *Gynura aurantiaca* bereits nach zwei Wochen die ersten Symptome, während bei der Buschtomate *Ren-tita* meist erst nach 3-4 Wochen CEV-Symptome diagnostiziert werden können. Dieser Nachteil wird jedoch nicht nur durch den weitaus geringeren Platzbedarf der Tomaten wieder wettgemacht, sondern auch dadurch, daß sich Tomaten leicht und in fast unbegrenzter Zahl aus Samen angezogen werden können, während sich Gynura nur vegetativ durch Stecklinge vermehren läßt.

Für die weiteren Versuche wurden daher ausschließlich Tomaten verwendet, da sie bei der eingesetzten Anzahl von ca. 300 Pflanzen erheblich weniger Platz beanspruchten als die entsprechende Menge Gynurapflanzen. Außerdem enthalten Tomatenblätter im Vergleich zu Gynurablättern wesentlich weniger Polysaccharide, die bei der Aufreinigung der Viroide erheblich

Tabelle 4: Infektiositätstest mit monomerer und dimerer Transkript-RNA des mutationsfreien KlonsCEV-(0)

Inokulum	Infektiositäts-Index ^{a)}	
	Tomate	Gynura
1) 1 µg monomere Transkript-RNA	3	3
2) 1 µg dimere Transkript-RNA	10	10
3) 10 ng natürliche CEV-CG1 RNA	10	10
4) 10 ng natürliche PSTV-KF440 RNA	10	10
5) Puffer allcine	0	0

^{a)}Der Infektiositäts-Index gibt die Anzahl der Pflanzen an, die 4 Wochen nach der Inokulation von jeweils insgesamt 10 inokulierten Pflanzen CEV-Symptome zeigten und bei denen die Viroidreplikation auch in der Dot-blot Analyse nachweisbar war.

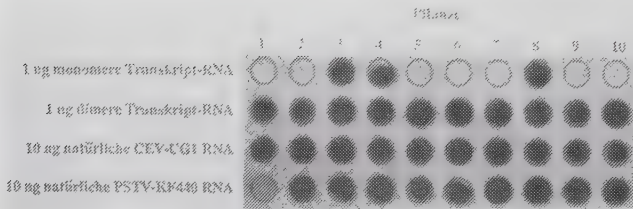


Abbildung 16: Dot blot zum Nachweis der Infektiosität von Transkript-RNAs in Tomate

In der linken Spalte ist aufgeführt, mit welchem Material die Pflanzen infiziert wurden. Von allen 10 Pflanzen pro Serie wurden 10 mg Blattäquivalent aufgetragen.

Als Hybridisierungsprobe diente CEV-CG1 Transkript-RNA mit (-)- Polarität.

stören können. Da beabsichtigt war, später aus den mit den Konstrukten infizierten Pflanzen die Viroid-RNA zu isolieren, um durch deren Resequenzierung zu ermitteln, ob die entsprechenden Mutationen auch an die Viroid-Nachkommenschaft weitergegeben waren, wurde in allen nachfolgenden Versuchen Tomatenpflanzen verwendet.

4.6. Konstruktion von Dimeren

Zur Konstruktion von dimeren CEV-Klonen wurden die monomeren Inserts mit BamHI aus den Plasmiden herausgeschnitten und für 2 Minuten einer Ligasereaktion unterzogen. Das dabei entstandene Gemisch von unterschiedlich miteinander verknüpften DNA-Fragmenten wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt. Gelbereiche mit Dimeren mit einer Kettenlänge von ca. 740 Bp wurden ausgeschnitten und über Isotachophorese eluiert. Die anschließende neue Klonierung erfolgte in dem mit BamHI linearisierten und zusätzlich dephosphorylierten "Bluescribe"- Vektor. Bei der Überprüfung der relativen Orientierung der monomeren Einheiten zueinander stellte sich heraus, daß alle untersuchten Klone die CEV- Einheiten in Kopf-Schwanz Verknüpfung enthielten.

4.7. Infektiositätstests mit CEV- Mutanten auf Tomate

Zum Nachweis der Infektiosität der CEV- Mutanten wurden zunächst die monomeren und dann die entsprechenden dimeren Formen konstruiert und daraus schließlich Transkript- RNAs in (+) Polarität synthetisiert. Zum Biotest wurden jeweils 10 Pflanzen mit je 1 µg RNA inokuliert und auf ihre Symptomausprägung hin beobachtet. Nach vier Wochen wurden von allen Pflanzen Blattproben entnommen, die mit Hilfe des "Dot blots" auf Viroidgehalt hin analysiert wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 5 aufgeführt. Von denjenigen Pflanzenserien, bei denen sich die Viroid-Mutanten vermehrten, sind die "Dot blots" in Abb. 17 zusammengestellt.

Die Pflanzen wurden nicht alle gleichzeitig inokuliert, sondern je nach Fertigstellung der Konstrukte blockweise zu verschiedenen Zeiten. Bei der Beurteilung der Infektiositäts-

Tabelle 5: Infektiosität von monomeren und dimeren CEV-DNA- Transkripten, die mit Hilfe von Phagen-RNA-Polymerasen synthetisiert wurden.

Mutante	Mutation	Infektiositäts-Index ^{a)}		relative Infektiosität ^{b)}
		Monomer	Dimer	
a) Rechte Hälfte				
(0)	keine	3	10	++
(1)	268:-C	0	0	0
(2)	123:-G	7	10	+++
(3)	130:A->G	0	0	0
(4)	161:G->C	0	0	0
(5)	117:-G			
	265/6: +G	0	0	0
(6)	129/30: +G			
	278:U->A	3	5	+
(7)	122/3: +G			
	265/6: +G	0	0	0
(8)	129/30: +G			
	278:U->A			
Deletion	(268 - 292)	5	0	0
b) Linke Hälfte				
(9)	49:G->A	0	0	0
(10)	70:G->A	0	0	0
(11)	315:G->A	10	10	+++
(12)	319:-C	0	0	0
(13)	53:G->A			
	70:G->A	10	10	+++
(14)	49:G->U			
	53:G->A			
	70:G->A	0	7	+
(15)	6:U->A			
	53:G->A			
	70:G->A	6	10	+++
(16)	2:-G			
	6:U->A			
	53:G->A			
	70:G->A			
	295:-C			
	352/3: +G	0	0	0

a) Der Infektiositäts-Index gibt die Anzahl der Pflanzen an, die ca. 4 Wochen nach der Inokulation von jeweils insgesamt 10 Tomatenpflanzen CEV Symptome zeigten (und bei denen auch die Viroid-Replikation durch "Dot blot" Analyse nachweisbar war (siehe Abb. 17).

b) 0 = nicht infektiös
 + = schwach infektiös
 ++ = mittelmäßig infektiös
 +++ = stark infektiös

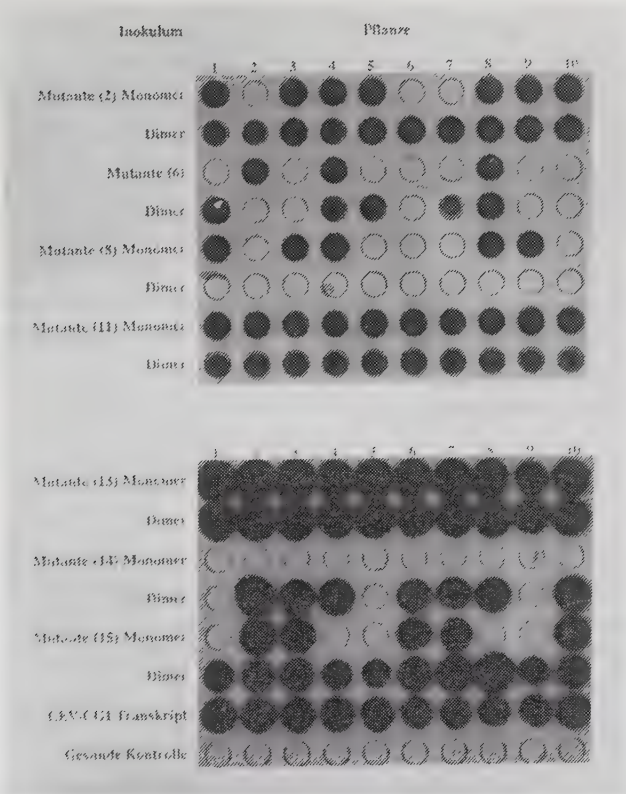


Abbildung 17: "Dot blot"-Analyse zum Viroidnachweis in Nukleinsäure-Extrakten von Tomatenpflanzen, die mit neu-konstruierten CEV- Mutanten inokuliert wurden.

Es wurden jeweils 10 Pflanzen mit 1 µg Transkript-RNA inokuliert. Vier Wochen nach der Inokulation wurden Blattproben entnommen und im "Dot blot" auf ihren Viroidgehalt hin untersucht. Es wurden nur diejenigen Pflanzen getestet, bei denen Symptome sichtbar waren. Die aufgetragene Menge an Nukleinsäure-Extrakt entspricht jeweils 10 mg Blattmaterial. Als Hybridisierungsprobe diente CEV-CG1-Transkript-RNA mit (-)-Polarität. Es wurden bei 70°C hybridisiert. Die Autoradiographie erfolgte über Nacht.

tests mußte berücksichtigt werden, daß die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Viroidinfektionen innerhalb der Pflanze vor allem von der Tageslicht-Intensität und der Temperatur während der Kultur im Gewächshaus stark beeinflußt wird. Beide Faktoren sind naturgemäß in den verschiedenen Jahreszeiten äußerst unterschiedlich. Im Hochsommer traten z.B. die ersten Symptome teilweise bereits nach zwei Wochen auf, während sie im Winter trotz einer Gewächshaus-Temperatur von 28 - 30°C oft erst nach 6 Wochen Inkubationszeit zu entdecken waren. Dazu wurden die Pflanzen außerdem zurückgeschnitten, so daß sie etwa zwei Wochen lang Gelegenheit hatten, neue Triebe auszubilden, welche erst die typischen Symptome zeigten. Daher sind die Zeiten bis zur erkennbaren Symptomausprägung nur von relativem Wert und auch nur innerhalb einer zur gleichen Zeit durchgeführten Bio-test-Serie vergleichbar.

4.7.1. Einfluß der Mutationen auf die Infektiosität und Virulenz

Von den 16 neu zusammengesetzten CEV-Mutanten erwiesen sich nur 7 Konstrukte als infektiös. Die Mutanten 2, 11, 13 und 15 waren schon als Monomere wesentlich stärker infektiös als das gleichzeitig getestete CEV-CGI-Transkript als Kontrolle. Die entsprechenden Dimeren verursachten sogar schon nach ca. 2 Wochen Symptome auf den Tomatenpflanzen.

Mutante 8 war interessanterweise nur als Monomer infektiös und nicht als dimeres Konstrukt. Zudem wurden die Pflanzen wesentlich später krank als bei der Kontrollinfektion. Bei einer Wiederholung des Versuchs erwies sich dann allerdings auch das Monomere als nicht-infektiös. Die zuvor beobachtete Infektion ist vermutlich auf eine Kontamination während der Inokulation zurückzuführen.

Bei der Mutante 14 war der umgekehrte Fall zu beobachten. Während nach der Inokulation mit Monomeren keine einzige Pflanze krank wurde, waren es bei Inokulation mit dem Dimeren 7 Pflanzen. Eine Kontrolle ergab hier allerdings, daß dieses Ergebnis in gleicher Qualität reproduzierbar war. Es wurden nämlich beim Dimeren abermals 7 von 10 Pflanzen krank, während

die Inokulation mit dem Monomeren zu keinen Erkrankungen der Pflanzen führte.

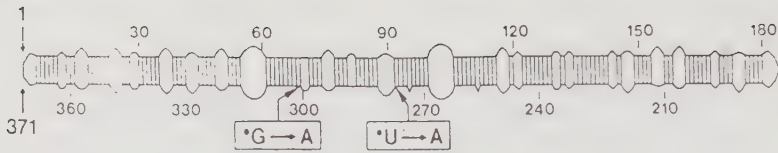
Zur vollständigen Erfassung der Viroidinfektionen wurden von allen Pflanzen Blattproben entnommen und mit Hilfe der "Dot Blot"-Analyse auf ihren Viroidgehalt hin untersucht. In Abb. 17 ist das Ergebnis einer solchen Analyse einiger Testserien dargestellt. Es zeigte sich, daß nur in denjenigen Pflanzen eine Viroid-Vermehrung stattgefunden hatte, die auch Symptome entwickelt hatten.

Um zu überprüfen, ob unter den neu-konstruierten replikationsfähigen Mutanten solche mit veränderter Virulenz waren, wurde ein gesonderter Biotest auf Tomatenpflanzen durchgeführt. Ca. 4 Wochen nach der Inokulation zeigten sich auf allen erkrankten Pflanzen etwa gleichzeitig Symptome, die keine Unterschiede in ihrer Intensität aufwiesen.

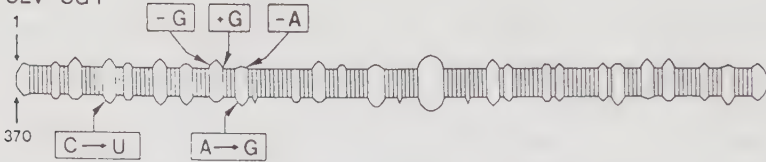
4.7.2. Vergleich mit bisher bekannten CEV-Varianten

Es wurden bisher ca. 11 CEV- Isolate sequenziert (Haseloff and Symons, 1981; Gross et al., 1982; Visvader et al., 1983; Visvader et al., 1985; Haas, unpubliziert). Die Abb. 18a zeigt eine Zusammenstellung von CEV- Isolaten, die in Martinsried auf der Ebene ihrer cDNA sequenziert wurden. Die Sequenzen der in Abb. 18b dargestellten CEV- Isolate wurden in der Gruppe von R.Symons ermittelt (Visvader et al., 1985). Auf deren unterschiedliche Pathogenität wird in Kapitel 5.2.2. gesondert eingegangen. Es zeigt sich auch hier, daß die gefundenen Mutationen überwiegend in den Bereichen auftreten, in denen bei CEV-CG1 die meisten Abweichungen von der "Mastersequenz" auftraten. Die Natur der einzelnen Austausche ist jedoch völlig verschieden von derjenigen des CEV-CG1. Dies ist allerdings auch zu erwarten gewesen, da es sich bei den anderen erhältlichen Sequenzen überwiegend um Mastersequenzen von CEV- Isolaten handelt, während die Mutationsverteilung von CEV-CG1 eine Verteilung innerhalb einer Mastersequenz darstellt.

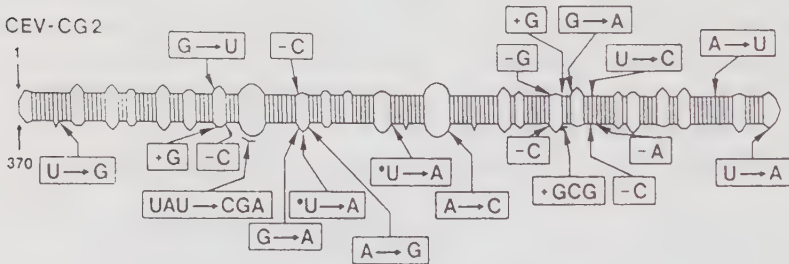
CEV-C



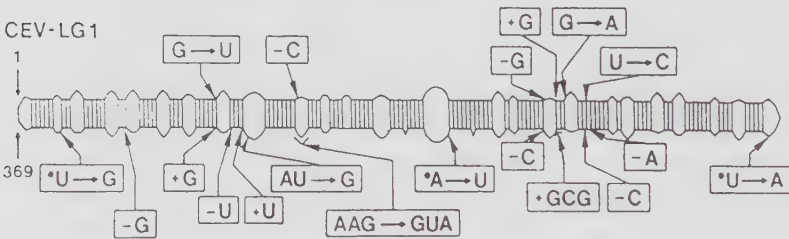
CEV-CG1



CEV-CG2



CEV-LG1



CEV-LG2

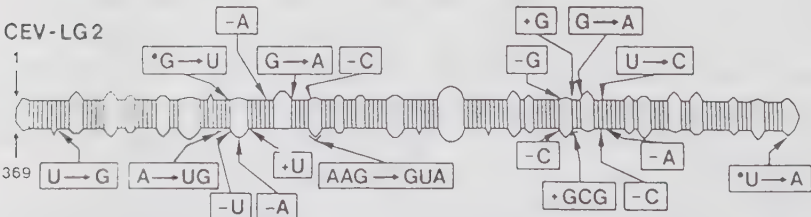


Abbildung 18a: Zusammenstellung der Sequenzen von CEV-Spezies im Vergleich zu CEV-C

Die oben dargestellten CEV-Spezies wurden von Haas et al. (unpubliziert) über ihre cDNA sequenziert. Die Stellen, an denen sie sich gegenüber CEV-C (Gross et al., 1982) unterscheiden, sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Art der Änderung ist in den entsprechenden Kästchen eingetragen.

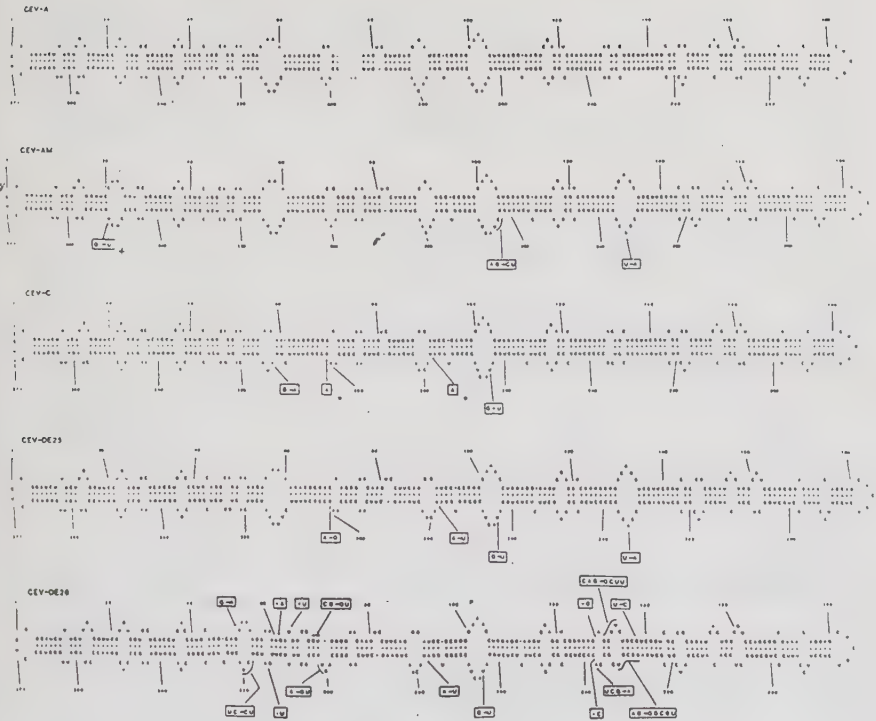


Abbildung 18b: Zusammenstellung der Sequenzen von CEV- Isolaten im Vergleich zu CEV-A

Diese CEV- Isolate wurden von Gross et al. (1982) sowie Visvader et al. (1985) sequenziert. Die Mutationen sind entsprechend Abb. 17a eingezeichnet. CEV-AM ist eine klonierte Variante von CEV-A.

4.8. Ergebnisse der Berechnung der Sekundärstruktur der Neu-Konstruierten Mutanten

Von den 16 konstruierten Klonen von CEV Mutanten waren nur 6 in der Lage, sich in den Tomaten-Testpflanzen zu vermehren. In *Abb. 19 a/b* sind die errechneten Sekundärstrukturen dargestellt, die sich nach Berücksichtigung der betreffenden Mutationen im CEV-CG1 ergeben. Der jeweils nicht abgebildete Teil ist ohne Mutationen.

a) Von den Mutanten, die sich in der rechten Hälfte von der CEV-CG1-"Mastersequenz" unterschieden, waren lediglich zwei vermehrungsfähig. Mutante (2) ist durch die Deletion des Nukleotids an Pos. 123 nur 369 Nukleotide lang; sie erwies sich als sehr infektiös. Mutante (6) hingegen enthält eine Insertion und einen Basenaustausch und ist 371 Nukleotide lang; wie sich später herausstellte, waren in der Viroid-Nachkommenschaft beide Mutationen revertiert und die Länge von 370 Nukleotide wieder hergestellt. Bei diesen beiden Mutanten (allerdings auch bei Mutante (4)) ist durch die Mutation die Sekundärstruktur am wenigsten verändert worden. Bei allen Mutanten, insbesondere bei (2), (5) und (8), in denen die beiden großen Loopstrukturen in der Nähe der zentralen konservierten Region in ihrer Form verändert waren, konnten keine Viroid-Nachkommenschaft in den Pflanzen nachgewiesen werden. Mutante (8), bei der in der zentral konservierten Region die Hind3-Schnittstelle deletiert war, zeigt erhebliche Änderungen in der Sekundärstruktur.

b) Bei den 6 "linksseitigen" Mutanten erwiesen sich 4 als infektiös. Mutante (11) enthält einen Basenaustausch an Pos. 315, der die Sekundärstruktur nicht beeinflusste; sie ist hoch infektiös. Erstaunlich ist das Verhalten der Mutante (10), die einen sehr häufig vorkommenden Austausch an Pos. 70 trägt. Obwohl auch hier die Sekundärstruktur fast nicht beeinflusst wird, war sie nicht in der Lage, sich auf den Testpflanzen zu vermehren. Durch eine zusätzliche Mutation in Pos. 53 (Mutante 13) war die Vermehrungsfähigkeit wieder hergestellt. Die Mutante (14) besitzt zusätzlich einen G/U Austausch an Pos. 49. Deren Infektiosität wurde dadurch wiederum im Vergleich zur

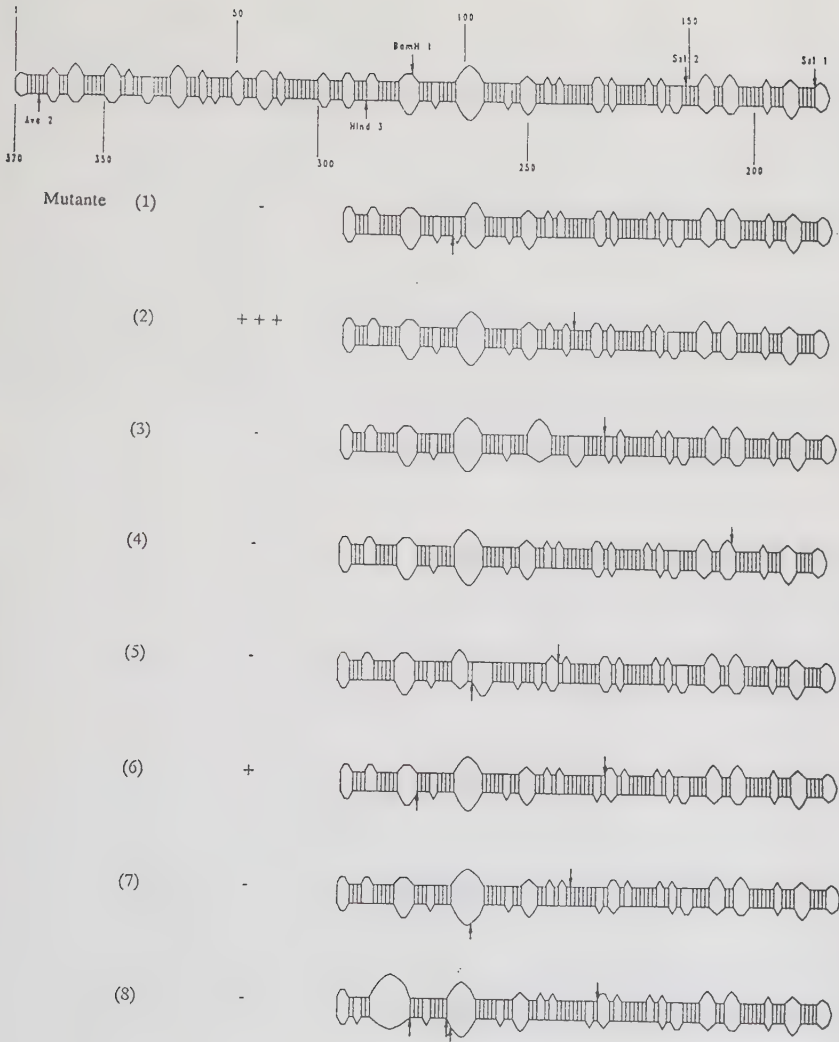


Abbildung 19a: Vergleich der Mutationen im *rechten Teil* des CEV-CG1

Oben ist das Sekundärstrukturmodell des CEV-CG1 abgebildet. Darunter sind die Strukturen der zusammengesetzten Varianten gezeigt, wie sie sich nach Berücksichtigung der Mutationen ergeben, die durch Pfeile symbolisiert sind.

Zusätzlich sind die im Text beschriebenen relativen Infektiositäten mit (+) und (-) angegeben.

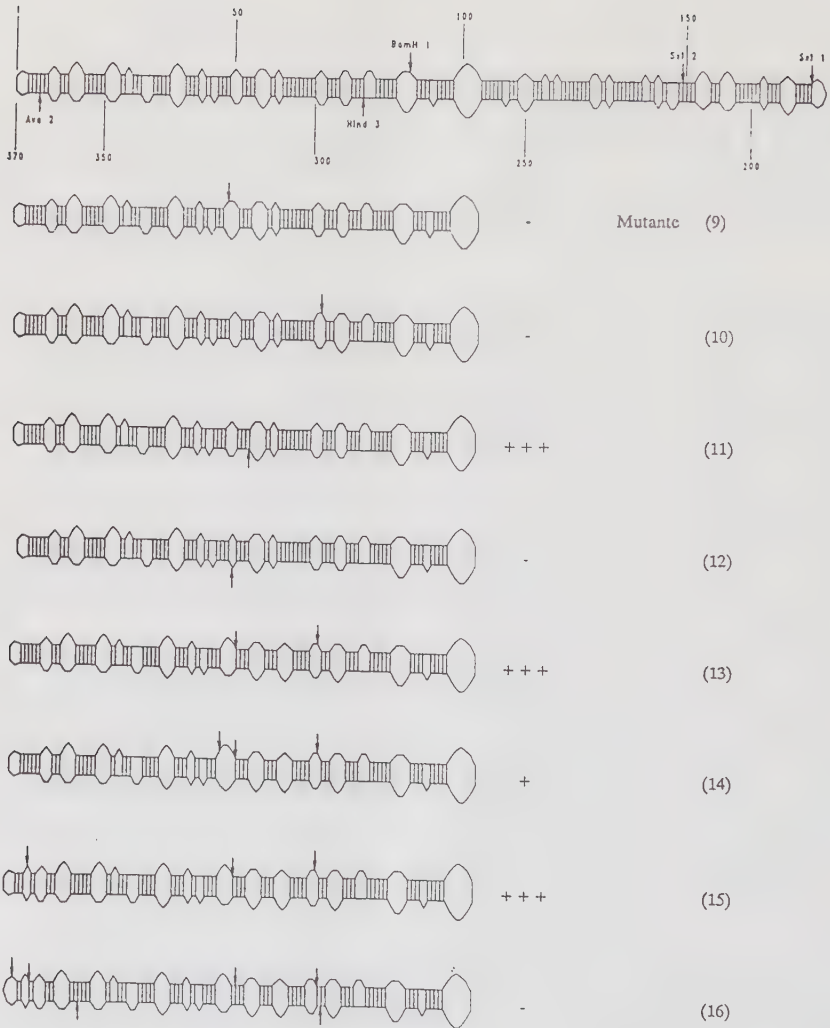


Abbildung 19b: Vergleich der Mutationen im *linken* Teil des CEV-CG1

Wie in Abb. 19a sind die Mutationsorte durch Pfeile gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils diejenige Sekundärstruktur, die sich nach Berücksichtigung der Mutationen ergibt.

Mutante (13) sehr eingeschränkt. Die Transkripte, die eine monomere CEV-Einheit enthielten, waren nicht mehr in der Lage, eine Infektion auszulösen, wohl aber diejenigen mit dimeren Einheiten. Ein G/A Austausch an dieser Stelle hatte bei Mutante (9) die Infektiosität "ausgeschaltet". Daß hier diese Wirkung nicht beobachtet wird, kann daran liegen, daß durch die Mutation an Pos. 53 in unmittelbarer Nachbarschaft der Loop, in dem sich nun Nukleotid 49 befindet, noch größer geworden und somit der Einfluß der Änderung in Pos. 49 geringer ist. Mutante (15) mit einer im Vergleich zu Mutante (13) zusätzlichen Mutation an Pos. 6 erwies sich ebenfalls als hoch infektiös. Eine Änderung der Primärstruktur an dieser Stelle bleibt offenbar ohne Wirkung auf die Infektiosität.

4.9. Sequenzierung der Viroid - Nachkommenschaft der CEV-Mutanten

Die Nachkommenschaft der vermehrungsfähigen 6 Mutanten sollte sequenziert werden, um zu überprüfen, ob die in den Konstrukten miteinander kombinierten Mutationen während der Replikation innerhalb des Pflanzensystems erhalten geblieben sind, oder ob eine Reversion zur Originalsequenz stattgefunden hat.

Als Methode wurde dafür zunächst die Sequenzierung der zirkulären RNA über ihre radioaktiv markierte cDNA mit Hilfe der Maxam-Gilbert-Technik ausgewählt, da diese mit sehr geringen Mengen an RNA auskommt. Dieses Verfahren konnte bereits erfolgreich zur Resequenzierung von PSTV und CSV aus ca. 0.5 g Blattmaterial angewendet werden (Tabler et al., in Vorbereitung; Müller-Derlich, persönliche Mitteilung). Dazu wurde die Viroid- RNA über bidirektionale Gelelektrophorese von den meisten anderen Bestandteilen des Nukleinsäure-Extraktes abgetrennt. Bei anschließenden reversen Transkriptionen allerdings zeigte sich, daß die hierbei gewonnene Viroid-RNA-Menge zur Sequenzierung bei weitem nicht ausreichte, da CEV in Tomate offenbar wesentlich schwächer akkumuliert als das PSTV und CSV.

Es wurde deshalb auf zwei verschiedenen Wegen versucht, radioaktive Transkripte in ausreichender Menge zu synthetisieren. Die Viroid RNA sollte nun aus erheblich größeren Mengen an Blattmaterial gewonnen werden, und zudem sollten neue Primer synthetisiert werden, mit denen eine Steigerung der Transkriptions-Effizienz möglich ist.

4.9.1. Aufreinigung von Viroid-RNA

Die Viroid-Isolation erfolgte aus ca. 50 g Blattmaterial, welches von jeweils sechs Pflanzen geerntet wurde. Dadurch mußte aber ein gewisser Informationsverlust in Kauf genommen werden, da die so erhaltene Sequenz der Viroid-RNA nicht die Population aus einer Einzelpflanze repräsentiert, sondern aus einem Gemisch der CEV RNA aus den zusammen extrahierten Pflanzen bestand. Nach Abtrennung der Polysaccharide wurde die LiCl- lösliche Fraktion des Nukleinsäure-Extraktes mittels präparativer HPLC fraktioniert. Der Viroidgehalt der dabei erhaltenen Fraktionen wurde im "Dot blot" und anschließender molekularer Hybridisierung untersucht. Viroid-haltige Fraktionen wurden vereinigt und die Viroid RNA durch Fällung gewonnen.

4.9.2. Selektion von Primern

Es hatte sich gezeigt, daß von den vorhandenen Primern die Oligonukleotide P14a und P15b (siehe Seite 13) zur Sequenzierung von CEV zwar von allen zur Verfügung stehenden Primern am besten geeignet waren, aber dennoch im Vergleich zu PSTV geringere Ausbeuten an radioaktiv markierten Transkripten ergaben. Bei der reversen Transkription von PSTV-RNA aus einer relativ wenig aufgereinigten "rohen" Probe entstanden mit dem Primer P15b bei vergleichbaren RNA- Mengen mit PSTV-RNA immer noch etwa die zehnfache Menge an längeren radioaktiven Transkripten. Daher sollten zur Sequenzierung Primer synthetisiert werden, die folgenden Kriterien genügen:

- 1) Der Primer sollte in dem Molekül-Bereich der replikationsfähigen CEV-Mutanten binden, in dem keine der Mutationen vorkamen;

2) Die Bindungsregion sollte möglichst auch einzelsträngige "Loop"-Bereiche enthalten, da hier eine Bindung des Primers an die CEV-RNA im Vergleich zu Regionen mit basengepaarten Bereichen eher möglich sein sollte;

3) Eine möglichst feste Bindung zwischen dem 3'-Ende des Primers und der CEV-RNA sollte durch mehrere GC- Paarungen erreicht werden;

4) Eine möglichst spezifische Bindung sollte durch lange Primer mit 20 Nukleotiden und mehr erreicht werden.

Die Bindungsstellen der nach diesen theoretischen Vorgaben ausgewählten Primer am CEV-CG1 und ihre Nukleotidsequenz sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Die Sequenz der CEV- spezifischen Primer und ihre Bindungsstelle auf dem CEV Molekül

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Bindungsregion</u> ^{x)}
PM1-21	dCCTGTTTCTCCGCTGGACGCC	158-178
PM2-21	dGGGTCCAAGGGCTTTCACCC	334-354
PM3-26	dGGGCGAGGCGCTTCAGCGACGATCGG	213-239
PM4-21	dCCTCAAGAAAGATCCCGAGGG	365-1/370-16

^{x)} Die Bindungsregion ist in Form der Position der entsprechenden Nukleotide des CEV Moleküls angegeben.

Die Primer wurden nach der Synthese gereinigt und in analytischen reversen Transkriptionen auf ihre Wirksamkeit untersucht. Es zeigte sich, daß die Primer PM1-21 und PM2-21 zur Sequenzierung am besten geeignet waren, da mit ihnen die höchsten Ausbeuten an radioaktiven Transkripten erzielt werden

konnten. Mit diesen wurde dann die RNA der sechs Mutanten-Klone revers transkribiert.

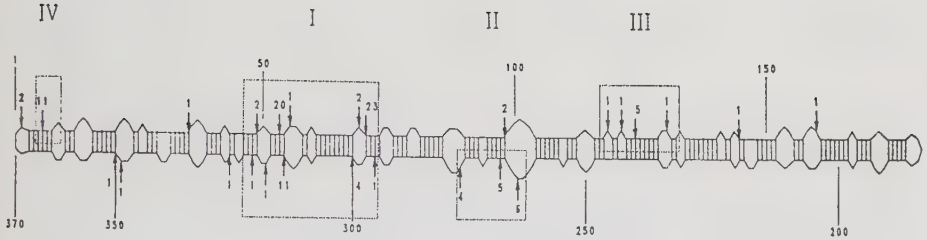
4.9.3. Sequenz der Nachkommenschaft der CEV- Mutanten

Mit Hilfe der Sequenzierung der Viroid cDNA läßt sich die Mastersequenz der Nachkommenschaft der CEV-Mutanten ermitteln. Eventuell neu auftretende Mutationen, die durch Mutationsprozesse in vivo entstanden sein könnten und nur einen kleinen Anteil an der Viroidpopulation haben, können auf diese Weise nicht entdeckt werden. Falls die in den zusammengesetzten Mutanten des CEV enthaltenen Mutationen jedoch während der Replikationsschritte stabil geblieben sind, sollten sie den überwiegenden Teil der Viroid-RNA darstellen und somit gut nachweisbar sein. Die Sequenzierungen der sechs infektiösen Mutanten-Klone 2, 6, 11, 13, 14 und 15 zeigten, daß mit Ausnahme von Mutante 6 alle zuvor auf der Ebene der DNA-Klone nachgewiesenen Mutationen erhalten geblieben sind. Außerdem konnten keine neuen, zusätzlich entstandenen Austausche, Insertionen oder Deletionen entdeckt werden. Dies bedeutet, daß fünf der sechs aus der von CEV- Population ausgewählten Mutanten sich stabil replizieren.

Bei Mutante 6 hingegen waren die beiden Mutationen an Position 129 und 278 nicht mehr vorhanden, so daß offenbar während der Replikation innerhalb der Pflanze eine Reversion zur Originalsequenz stattgefunden haben mußte. Damit ist auch erklärbar, daß bei dieser Mutante die Entwicklung der Infektion die längste Zeit beanspruchte. Möglicherweise waren die Nachkommen der Transkript- RNA erst nach der Reversion zur ursprünglichen Sequenz in der Lage, durch eine ausreichend starke Replikation die Pflanzen sichtbar zu schädigen.

Aus Kontrollgründen wurde auch die Viroid-Nachkommenschaft aus Pflanzen resequenziert, in welchen ca. sechs Monate lang die Vermehrung des Ausgangs-Isolates CEV-CG1 angedauert hatte. Es konnten dabei weder Änderungen in der Primärstruktur noch eine auffällige Heterogenität der Sequenz festgestellt werden, wie sie bei CEV-CG1 aufgetreten war.

CEV-CG1



CEV-J

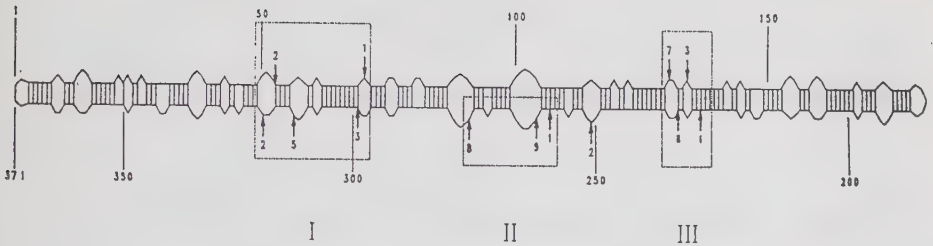


Abbildung 20: Vergleich der Mutationsorte und -häufigkeiten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten CEV- Isolate CEV-CG1 (oben) und der in Australien analysierten CEV-J (unten)

Diejenigen Bereiche, in denen Mutationen gehäuft auftreten, sind durch Einrahmung hervorgehoben. Die Bereiche I und II befinden sich in den Spezies etwa an gleicher Position. Bereich III ist im CEV-J auch auf den unteren Molekülteil ausgedehnt. Die Mutation an Position im Bereich IV tritt nur im CEV-CG1 auf.

Visvader et al. (1985) haben bei der Sequenzierung einiger CEV- Klone des australischen Feldisolates CEV-J, die aus nur einer Pflanzenprobe erhalten wurden, gezeigt, daß die CEV- RNA aus Varianten besteht, die sich an wenigen, charakteristischen Stellen voneinander unterscheiden.

In Abb. 20 wird die dabei erhaltene Mutationsverteilung mit derjenigen verglichen, die in der vorliegenden Arbeit von CEV-CG1 ermittelt wurde. Die von Visvader et al. (1985) gefundenen Mutationen sind auf das Isolat CEV-A bezogen. Es zeigt sich auf den ersten Blick, daß die Art der Mutationsverteilung in beiden Fällen sehr ähnlich ist. In beiden Isolaten treten Mutationen überwiegend in den mit I, II und III gekennzeichneten Bereichen auf, die in etwa an gleichen Positionen im CEV- Molekül liegen. Die Position des Bereichs I entspricht in seinem linken Teil ungefähr der "VM"- Region des PSTV, während er in seinem rechten Teil weit in die Region des PM Loops 1 hineinreicht.

Bei der genaueren Betrachtung der Mutationspositionen und der Art der gefundenen Austausche ergeben sich jedoch eine Reihe von Unterschieden. In Tabelle 7 sind die häufigsten Mutationen und ihr Typ gegenübergestellt.

Tabelle 7: Vergleich der Mutationsorte und -arten der Isolate CEV-CG1 und CEV-J

CEV-CG1			CEV-J		
Pos.	Art der Mutation	Häufigkeit	Pos.	Art der Mutations	Häufigkeit
6	U->A	11			
53	G->A	20			
70	G->A	23	134	+G	3
122/3	+G	5	129/30	+U	7
265/6	+G	6	263/4	AG->CU	9
268	-C	5			
278	U->A	4	278	A->U	8
300	A->G,T	4	301	U->A	3
315	G->A	11	313	G->A	5

Einige Mutationsorte sind zwar fast an gleichen Positionen zu finden wie z.B. zwischen Nukleotid 260-265, aber die dort gefundenen Austausche sind völlig unterschiedlicher Natur. Während sich beim CEV-CG1 die meisten Mutationen im Bereich I befinden, liegen sie im CEV-J im Bereich III, der sich zudem auch auf den gegenüberliegenden Molekülteil erstreckt. Im linken Molekülteil jenseits von Bereich I ist CEV-J ohne Mutationen. Bei CEV-CG1 hingegen ist das Nukleotid an Position 6 besonders häufig mutiert.

In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, daß der bei der Konstruktion von CEV-CG1 Klonen voller Länge zuerst erhaltene Klon (vgl. Kapitel 4.1.6 und Abb. 8) sehr viele Mutationen fast ausschließlich im Bereich I aufwies. Im Verlauf der nachfolgenden Sequenzierungen der 75 Teilklone konnte allerdings keine CEV-CG1- Variante mit derart vielen Mutationen mehr gefunden werden.

5. Diskussion

5.1. Analyse der Sequenzvariation des CEV

Bei den bisherigen Struktur-Untersuchungen von Viroiden hat sich herausgestellt, daß die Sequenz der RNA verschiedener Viroid-Feldisolate innerhalb einer Viroidart nicht vollständig konserviert ist. Es gibt vielmehr Isolate, die sich voneinander durch Basenaustausche, Deletionen oder Insertionen unterscheiden. So wurden beim PSTV inzwischen insgesamt sieben verschiedene Isolate sequenziert, die sich in maximal acht solcher Mutationen voneinander unterscheiden. Sie besitzen jedoch alle die gleiche Kettenlänge von 359 Nukleotiden (Sänger, 1984). Beim CSV wurden zwei Isolate sequenziert, die sich in insgesamt zehn Mutationen sowie in ihrer Kettenlänge um zwei Nukleotide voneinander unterschieden (Haseloff and Symons, 1981; Gross et al., 1982). Im Fall des CCCV ist der Zusammenhang insofern noch komplizierter, als es hier innerhalb einunddesselben Viroids infolge der Duplikation von Teilbereichen der Sequenz zur Synthese von vier unterschiedlich langen RNAs in in der Cocos-Palme kommt (Haseloff et al., 1982). Die Viroide HSV, CPFV und GV, die in Tabelle 1 iaufgeführt sind, besitzen untereinander mindestens 95 % Sequenzhomologie und können somit als Isolate einer einzigen Viroidart angesehen werden. Sie weisen auch keine Unterschiede in den von ihnen bei Gurke oder Tomate induzierten Symptomen auf (Ohno et al., 1983; Sano et al., 1984, 1986).

Beim CEV wurden bisher elf verschiedene Feldisolate sequenziert (Gross et al., 1982; Visvader et al., 1983; 1985). Die dabei nachgewiesenen Unterschiede in der Primärstruktur sind allerdings wesentlich größer als bei all den anderen oben genannten Viroiden, denn es wurden bis zu 26 Änderungen registriert, was einer Sequenzhomologie von ca. 92 % entspricht (Visvader et al., 1985). In jüngster Zeit wurden von Citrus mit typischen CEV-Symptomen außerdem zirkuläre, Viroid-ähnliche RNAs isoliert, von denen man aufgrund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im Gel annimmt, daß es sich um Deletionsvarianten des CEV handeln könnte. Die genaue

Sequenzanalyse dieser RNAs steht allerdings noch aus (Schlemmer et al., 1985; Duran-Vila et al., 1986).

Diese Ergebnisse zeigen, daß Sequenz-Heterogenitäten innerhalb eines Viroid- Isolates bisher nur im Fall des CEV experimentell bestimmt worden sind. Die Sequenzen wurde entweder durch direkte Sequenzierung der Viroid-RNA oder ihrer cDNA ermittelt. Mit diesen Methoden können Sequenzheterogenitäten aber nur dann erkannt werden, wenn die in der RNA- Population vorhandenen Varianten entweder in genügend großer Menge vorkommen oder wenn sie sich in der Länge voneinander unterscheiden. Im letzteren Fall treten dann sowohl im Trenngel als auch im Sequenzgel Zusatzbanden auf. Im Sequenzgel heben sie sich in ihrer Intensität von den stets vorhandenen sog. "Schattenbanden" ab, die durch natürliche Abbrüche während der Sequenzierungsreaktionen oder durch Autoradiolyse entstehen. Wenn man allerdings Viroid-Isolate sequenziert, die in klonierter Form vorliegen, dann können auch Varianten mit solchen Mutationen erkannt werden, die weniger häufig sind. Mit dieser Methode konnten bei drei verschiedenen Isolaten des CEV 17 Sequenz-Varianten gefunden werden (Visvader et al., 1985).

Eine Sequenzanalyse klonierter Varianten könnte also auch bei anderen Viroiden zeigen, ob die isolierte Viroid-RNA aus den zur Vermehrung verwendeten Pflanzen tatsächlich einheitlich ist oder wie im Fall des CEV eine Mischpopulation darstellt.

Die Auswertung der eigenen Sequenzdaten aus Kapitel 4.2. in Abb. 12 zeigt, daß bei dem untersuchten Isolat CEV-CG1 Mutationen auftreten, die über das gesamte Genom verteilt sind, wobei sie in bestimmten Bereichen allerdings häufiger auftreten. Im folgenden wird diese charakteristische Verteilung der Mutationen mit der in den bisher bekannten CEV-Isolaten verglichen und versucht, die möglichen Ursachen der beobachteten Sequenzheterogenität zu erklären.

5.1.1. Verteilung der Mutationen auf der RNA

Die Unterschiede in der in Kapitel 4.9.3 beschriebenen Verteilung der Mutationen könnten ihre Ursache darin haben, daß die CEV-Isolate in verschiedenen Pflanzen vermehrt wurden.

Im vorliegenden Fall des CEV-CG1 wurden zunächst Nukleinsäureextrakte aus Citrus gewonnen und dann zur Inokulation von Chrysantheme benutzt. Dann wurden Nukleinsäure-Extrakte aus erkrankten Chrysanthemen gewonnenen, und mit diesen wurden schließlich Gynura- Pflanzen inokuliert, da sich in dieser Wirtspflanze das CEV am besten vermehrte. Das australische CEV-J wurde hingegen nur auf Tomate übertragen und dann ausschließlich dort vermehrt.

Es bestehen keine Zweifel daran, daß infolge dieser unterschiedlichen Wirtspassage unterschiedliche Varianten einer CEV-Population deshalb selektioniert werden, weil sie sich z.B. in der entsprechenden Wirtspflanze besser vermehren können.

5.1.2. Mögliche Ursachen der Sequenzvariation

Die gefundene Variabilität der CEV- RNA kann eine Reihe von Ursachen haben, die sowohl in der Natur des Viroids als auch in den Mechanismen der Replikation begründet sein könnten. Durch die Art der Klonierung ist es außerdem auch noch möglich, daß Sequenzänderungen in vitro erzeugt werden. Für die Sequenzvariation des CEV bieten sich folgende fünf Erklärungen an:

(1) Die an der in vivo Replikation von Viroiden beteiligte DNA- abhängige RNA-Polymerase II transkribiert die Viroid-RNA mit gelegentlichen Fehlern. Auf diese Weise entstehen so innerhalb der Pflanze kontinuierlich neue Sequenzvarianten . Es ist bekannt, daß die Fehlerrate bei der Replikation der RNA des Phagen Q β 10^{-3} - 10^{-4} beträgt, während sie sich bei DNA-Polymerasen im Bereich von nur 10^{-8} - 10^{-11} bewegt (Holland et al., 1982). Die große Anzahl unterschiedlicher Sequenzvarianten, die bei den Sequenzierungen des CEV-CG1 gefunden wurde, stellt gewissermaßen eine "Momentaufnahme"

innerhalb der Pflanze zum Zeitpunkt der Extraktion dar. Aufgrund der natürlichen Selektion in der Pflanze können natürlich nur noch diejenigen Varianten replizieren, die dafür die strukturellen Voraussetzungen besitzen. Alle Varianten, die im Hinblick auf ihre Vermehrungsfähigkeit "letale" Mutationen tragen, sind naturgemäß auch nicht in der Lage, sich weiter zu replizieren. Dafür spricht z.B., daß eine große Anzahl von Mutationen gefunden wurde, die jeweils nur einmal auftreten.

(2) Das CEV-CG1 wurde zunächst aus Citrus isoliert und es ist durchaus denkbar, daß die Infektion schon seit Jahrzehnten in diesen Bäumen "persistierte", ohne zu deren Absterben zu führen. In diesem Zeitrahmen könnten also sehr viele Sequenzvarianten akkumulieren, die alle zur Replikation fähig sind. Bei Viroiden wie dem CSV und dem PSTV, die krautige und im Prinzip einjährige Pflanzen befallen, die allerdings ebenso wie Citrus seit Jahrzehnten vegetativ vermehrt werden, ist die Lebensdauer der Primärwirte vor allem wegen der oft letalen Wirkung der Viroide wesentlich kürzer. Dies könnte dazu führen, daß hier eine geringe Chance für die Selektion von mehreren sich stabil replizierenden Mutanten besteht, die gemeinsam innerhalb dieser Pflanzen-Arten existieren können.

(3) Die molekulare Klonierung des CEV-CG1 erfolgte durch eine ganze Reihe von Schritten, die alle mehr oder weniger mit Fehlern behaftet sind. Die in vitro Transkription der Viroid-RNA in cDNA mit Hilfe einer viralen reversen Transkriptase könnte aufgrund der rigiden Sekundärstruktur des Viroids fehlerhaft verlaufen und zu einzelnen Punktmutationen führen. Auf diese Weise könnten die vielen einzelnen Mutationen im CEV-CG1 Genom entstehen.

(4) Bei der anschließenden in vivo Amplifikation der CEV-Varianten mit Hilfe von Plasmiden in E.coli ist es ebenfalls möglich, daß Mutationen gesetzt werden. Dafür spricht, daß im Verlauf der Sequenzierungen der Nachkommenschaft der CEV-Varianten von den 20 Konstrukten drei die zuvor eindeutig nachgewiesenen Mutationen verloren hatten. Es ist daher nicht

auszuschließen, daß eine Selektion von bestimmten Mutationen auch während der Amplifikation in der Bakterienzelle erfolgt.

(5) Bei der Klonierung von dimeren und multimeren Einheiten aller Viroide in Kopf/Kopf- oder Schwanz/Schwanz-Verknüpfung erhält man stets palindromartige Strukturen. Solche Palindrome werden jedoch bei der Klonierung in *E.coli* aufgrund von *in vivo* DNA-Reparaturprozessen im Vergleich zu "normalen" Sequenzen häufig deletiert (Collins, 1980). Man kann also annehmen, daß die Palindrom-Struktur der Viroide von den betreffenden Reparaturenzymen vermutlich mit großer Treffsicherheit erkannt wird. Deshalb muß man damit rechnen, daß solche Konstrukte während der Plasmidreplikation einem hohen "evolutionären" Druck unterliegen und unter Umständen nicht gar nicht erst amplifiziert werden.

5.1.3. Zeitlicher Verlauf der Sequenzvariation

Im Rahmen der Infektiositäts-Versuche mit den CEV-Konstrukten wurden *Gynura*-Pflanzen verwendet, in denen nach häufigem Zurückschneiden 6 Monate lang eine kontinuierliche CEV-Vermehrung stattgefunden hatte, ohne daß die Pflanzen abstarben. Bei der Sequenzierung dieser Viroid-Nachkommenschaft auf der Ebene der cDNA konnte überraschenderweise jedoch keine Anzeichen einer Sequenz-Heterogenität nachgewiesen werden, wie sie im Fall der zur Klonierung verwendeten Ausgangsprobe gefunden worden war. Bei ca. 50 % der sequenzierten Teilklone, die den "linken" Teil des CEV-CG1 enthielten, waren lediglich an den Positionen 53 und 70 Austausche zu finden. Die ursprünglich gefundene Sequenz-Heterogenität des Ausgangsmaterials ist also entweder über einen wesentlich längeren Zeitraum während der Pflanzenpassagen entstanden, oder sie beruht darauf, daß der ursprünglich zur Inokulation von *Gynura* verwendete Nukleinsäureextrakt aus kranken Citrus bereits zahlreiche Varianten des CEV enthielt.

5.2. Infektionsstudien mit klonierten CEV- Varianten

Mit dem Begriff der "Virulenz" wird die Fähigkeit von Krankheitserregern bezeichnet, Krankheitssymptome unterschiedlicher Stärke zu induzieren. Bei der Infektion von Tomatenpflanzen mit dem PSTV wurde beobachtet, daß bestimmte Feldisolate unterschiedlich starke Symptome hervorrufen können (Schnölzer et al., 1985). Auch beim CEV wurden solche Isolate mit unterschiedlicher Virulenz für Tomate gefunden (Visvader et al., 1985). Unter den in der vorliegenden Arbeit untersuchten CEV-fand sich jedoch keine einzige Mutante, die ein abweichendes Symptombild auf Tomate oder Gynura erzeugte. Es war vielmehr so, daß alle Konstrukte das gleiche und völlig einheitliche Krankheitsbild auf Tomate und Gynura hervorriefen.

Da das ursprüngliche CEV-Isolat CG1 aus einer Vielzahl von Varianten besteht, konnte durch Inokulation von Pflanzen mit diesem Gemisch natürlich nicht herausgefunden werden, ob das beobachtete Krankheitsbild nur von einer oder durch das Zusammenwirken von mehreren dieser Varianten induziert wird. Daher wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit Testpflanzen mit Transkript-RNA der entsprechend konstruierten Klone inokuliert. Mit diesem genetisch einheitlichen Material sollte analysiert werden, ob bestimmte Mutationen einen Einfluß auf die biologischen Eigenschaften der Konstrukte haben. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Kapitel 4.7. aufgeführt.

5.2.1. Infektiositätsunterschiede monomerer und dimerer Transkript RNAs

Bei den in Kapitel 4.5. beschriebenen Infektiositäts-Tests hatte sich gezeigt, daß die Transkript-RNA, in der dimere CEV-RNA in Kopf/Schwanz Verknüpfung und in (+) Orientierung enthalten ist, etwa dreimal so infektiös ist wie die Transkript-RNA mit nur einer CEV Einheit. Ein ähnliches Verhalten konnte auch bereits im Fall von PSTV beobachtet werden. Bei der Inokulation von Tomate mit PSTV-Klonen, die an der BamH1-Schnittstelle miteinander verknüpft waren, erwiesen sich multimere Einheiten stets als wesentlich infektiöser als die entsprechenden monomeren Formen. Bei der Inokulation von

Tomate mit einzelsträngiger Phagen-DNA, die die PSTV-Inserts der betreffenden Klone enthielt, konnten vergleichbare Unterschiede in der Infektiosität beobachtet werden (Tabler, 1986). Versuche dieser Art wurden mit dem CEV bisher jedoch nicht durchgeführt.

Damit nach der mechanischen Inokulation von Pflanzen mit in vitro synthetisierter linearer Transkript-RNA ein normaler Viroid-Replikationszyklus beginnen kann, muß diese lineare RNA in der Zelle wahrscheinlich zunächst zirkularisiert werden. Die höhere Infektiosität der dimeren und multimeren Viroid-RNA läßt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, daß bei ihnen die Entfernung der terminalen Fremdsequenzen und die anschließende Zirkularisierung der "reinen" Viroid-RNA leichter ablaufen kann als bei Monomeren. Bei langen dimeren und multimeren Viroid-Einheiten ist nämlich die Ausbildung einer Sekundärstruktur und die Spaltung und Zirkularisierung eher möglich als bei Monomeren. Das ist insofern nicht verwunderlich, als auch in vitro Prozessierungsversuche mit PSTV, CSV und CEV-CG1 mit Zellkern-Extrakten gezeigt haben, daß nur aus solchen Transkripten zirkuläres Viroid entsteht, bei denen sich aufgrund von bestimmten Sequenzduplikationen eine spezielle Prozessierungs-Struktur ausbilden konnte (Tsagris et al., 1987).

5.2.2. Zusammenhang zwischen Primärstruktur, Replikabilität und Infektiosität

Wenn man die in Abb. 12 dargestellte Häufigkeit einzelner Mutationen innerhalb der CEV-CG1 Population betrachtet, dann zeigt sich, daß diejenigen Mutationen, die am häufigsten auftreten, zu keiner Änderung der Infektiosität führen. Man kann daher davon ausgehen, daß das beobachtete Krankheitsbild auf den Testpflanzen von jeder einzelnen im CEV-Isolat CG1 enthaltenen Variante in gleicher Weise hervorgerufen werden kann und daß durch ihr Zusammenwirken keine Symptom-Verstärkung induziert wird. Die häufig auftretende Mutation an Position 70 ist von dieser Interpretation allerdings ausgenommen, da sich die Mutante (10), die nur diese Mutation trägt, als nicht infektiös erwies. Da das CEV-CG1 in zwei

unabhängigen Hälften kloniert wurde, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß unter natürlichen Bedingungen solche Mutationen nur in Verbindung mit weiteren kompensierenden Mutationen auf der rechten Hälfte des CEV vorkommen.

Da sich die einzelnen infektiösen Konstrukte auf Tomate und Gynura etwa gleichstark vermehrten, muß man davon ausgehen, daß auf bestimmte häufig auftretende Mutationen innerhalb der Pflanze entweder nur ein sehr geringer oder gar kein Selektionsdruck ausgeübt wird. Andere Mutationen führen jedoch dazu, daß die entsprechenden Konstrukte nicht mehr in der Lage sind, sich zu replizieren. Es ist aber auch hier nicht auszuschließen, daß diese im Experiment "letal" Mutationen unter natürlichen Bedingungen kompensiert werden können. Die Zusammensetzung der CEV-Konstrukte erfolgte im Experiment nämlich unter der Vorgabe, jeweils eine Hälfte ohne Mutation zu verwenden. Ob solche kompensatorischen Effekte tatsächlich auftreten, läßt sich jedoch nur durch weitere Versuche mit entsprechend neu konstruierten Mutanten klären.

Bei einer zusammenfassenden Betrachtung der Mutationsorte innerhalb des CEV- Genoms , wie sie in Abb. 20 und 19a/b dargestellt sind, fällt auf, daß die meisten Änderungen innerhalb oder am Rand einer Loopstruktur auftreten. Dies konnte auch im Fall der bisher gefundenen Isolate des PSTV (Sänger, 1984) beobachtet werden. Es ist daher zu vermuten, daß die während der Replikation der Viroid-RNA entstehende lineare (+) RNA bereits zu Beginn Sekundärstrukturen ausbildet. Diese könnten ihrerseits die Fehlerrate bei der nachfolgenden Neusynthese der weiteren Viroid-RNA so beeinflussen, daß aufgrund der entstehenden Basenpaarungen in den Helixbereichen die Ausbildung von Mutationen energetisch benachteiligt ist. Die Mutationen, die im Rahmen der Sequenzierungen meist nur einmal festgestellt wurden, könnten möglicherweise auf einen solchen zu einer hohen Fehlerrate führenden Mechanismus bei der Replikation beruhen. Solche Varianten sind vermutlich auch nicht mehr vermehrungsfähig. Dafür sprechen auch die Ergebnisse von Visvader et al. (1985),

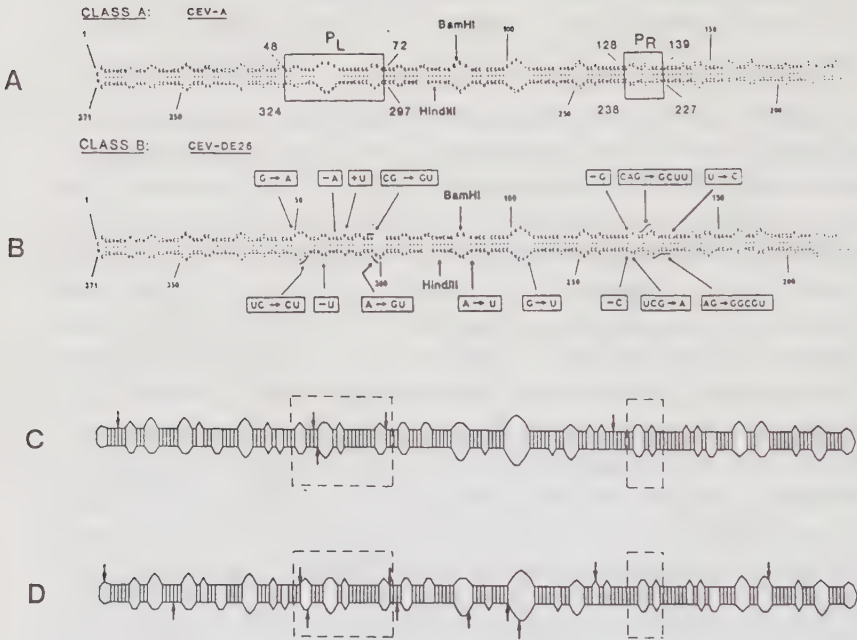


Abbildung 21: Zusammenfassung der erhaltenen Infektivitätsdaten und Vergleich mit einem Pathogenitätsmodell

Die beiden oberen mit A und B bezeichneten Strukturen sind aus Visvader et al. (1986) entnommen. CEV Spezies mit Struktur A lösen nach einem Pathogenitätsmodell der Autoren starke Symptome auf Tomaten aus, während Infektionen mit solchen im Modell B gekennzeichneten Änderungen fast ohne Symptome bleiben.

Mit P_L und P_R sind diejenigen Bereiche gekennzeichnet, innerhalb derer Mutationen zu Änderungen in der Infektivität der resultierenden Moleküle führen sollen.

Dem gegenübergestellt sind die eigenen ermittelten Resultate. In Struktur C sind die Mutationen zusammengefaßt, die zu infektiösen Varianten geführt haben.

Struktur D enthält die Mutationen, die in Varianten auftraten, welche nicht mehr zur Replikation in der Lage waren.

Durch die gestrichelten Linien ist die Lage der in A aufgeführten Boxen P_L und P_R gekennzeichnet.

nach denen sich einige klonierte Varianten des Typs CEV-J als nicht infektiös erwiesen.

Aufgrund ihrer Versuche postulierten Visvader et al. (1985), daß es beim CEV Bereiche gibt, durch deren Nukleotide die Krankheitssymptome moduliert werden. Sie bezeichnen diese Domänen als die linke und die rechte Pathogenitäts-Region P_L und P_R . Die Lage dieser Domänen auf dem CEV Molekül ist in Abb. 21 wiedergegeben

Hinsichtlich ihrer Struktur und ihrer Pathogenität ordneten Visvader et al. ihre australischen Isolate in zwei Klassen ein, die Klasse A verursachen auf Tomate starke Symptome, während die Isolate der Klasse B nur milde Symptome auslösen. Zur Gegenüberstellung der eigenen Resultate wurden in Modell C diejenigen Mutationen eingezeichnet, die keine Einschränkung der Infektiosität verursachten. In Modell D sind schließlich nur solch Mutationen eingetragen, die in all den Varianten auftraten, die sich als nicht mehr replikationsfähig erwiesen. Es ist zu erkennen, daß auch Mutationen wie z.B. an Pos. 6 oder 123, die außerhalb der Domänen P_L und P_R lokalisiert sind, die Infektiosität beeinflussen.

Für eine genauere Analyse der Funktionen einzelner Bereiche auf dem Viroidgenom ist es erforderlich, den Einfluß zusätzlicher Mutationen auf die biologischen Eigenschaften der Viroide hin zu untersuchen. Solche Änderungen lassen sich zielgerichtet über in vitro Mutagenese durchführen, so daß es in Zukunft möglich sein sollte, die Auswirkung von solchen Mutationen auch beim CEV zu untersuchen, die in der natürlichen Population nicht vorkommen. So haben Owens et al. (1986) mittels dieser Methode beim PSTV gezeigt, daß durch Einführung einer Mutation in Pos. 284 dessen Infektivität zerstört wurde.

Die Eigenschaft des CEV, in der Pflanze in Form einer Population infektiöser, d.h. sich unabhängig voneinander replizierender Varianten aufzutreten, konnte bisher bei keinem anderen Viroid beobachtet werden.

Um die Infektiosität und somit Replikationsfähigkeit von CEV-Transkripten zu bestimmen, könnte man versuchen, ihre Prozessierbarkeit mit Hilfe von in vitro Prozessierungs-Experimenten zu testen. Solche Versuche wurden daher mit der nicht-infektiösen dimeren Transkript-RNA des CEV-Klons 1 mit seinen 22 Mutationen und der infektiösen dimeren RNA des CEV-CG1 in Gegenwart von Zellkernextrakten durchgeführt (Tsagris, 1987). Es stellte sich dabei heraus, daß aus der RNA beider Klone monomere Viroideneinheiten herausgeschnitten und zirkularisiert wurden, obwohl sich die RNA eines Klons als nicht infektiös erwiesen hatte. Infolgedessen kann dieser experimentelle Ansatz nicht zu einem "Vor-screening" der Transkripte eingesetzt werden. Das ist insofern nicht verwunderlich, als daß die Prozessierung der oligomeren RNA-Transkripte zu monomeren Einheiten in der Replikation der Viroide nur einige Schritte innerhalb eines komplexen Reaktionsablaufes darstellt.

5.2.3. Beziehungen zwischen der Sequenz und der Virulenz des CEV

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit hat sich herausgestellt, daß alle CEV Varianten, die sich auf den Testpflanzen als vermehrungsfähig erwiesen, die gleichen Symptome verursachen. Weder bei Gynura noch bei Tomate waren Unterschiede im Krankheitsbild auszumachen. Bei Untersuchungen am PSTV hat sich hingegen gezeigt, daß Viroid-Isolate existieren, die sich in ihrer Virulenz für die Tomate erheblich voneinander unterscheiden und je nach Isolat milde, mittelstarke, sehr starke und zum Absterben führende Symptome auslösen können (Gross et al., 1981; Sängler, 1984; Schnölzer et al., 1986; Tabler, 1986).

Visvader et al. (1985) haben bei entsprechenden Untersuchungen an verschiedenen CEV-Isolaten und ihrer Sequenzvarianten festgestellt, daß sie sich aufgrund ihrer Virulenz auf Tomate in zwei Gruppen einteilen lassen, die entweder milde oder starke Symptome verursachen. Die Sequenz der Viroide wurde hierbei zwei "Mastersequenzen" zugeordnet. In Abb. 21 sind diese beiden bereits erwähnten Strukturen als

"Class A" (starke Symptome) und "Class B" (milde Symptome) bezeichnet. Ein Vergleich der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Sequenz-Varianten zeigt, daß bestimmte Mutationen im Bereich P_L die Infektiosität nicht beeinflussen, während sie durch andere Mutationen zerstört wird. Allerdings läßt sich der erhaltene CEV-Klon 1 mit seinen überwiegend in der Domäne P_L auftretenden 22 Mutationen nicht in dieses Schema einordnen.

Obwohl die untersuchten Konstrukte bei Tomate ein völlig einheitliches Symptombild verursachten, waren dennoch in der zeitlichen Entwicklung der Infektion Unterschiede zu beobachten. Bei der Bestimmung der CEV-Konzentrationen in Pflanzenextrakten mit Hilfe des "Dot blot" Verfahrens stellte sich heraus, daß alle die Pflanzen, die sehr wenig Viroid enthielten, auch mit großer Verspätung Symptome entwickelten. Weitere Übertragungsversuche mit der Nachkommenschaft dieser Konstrukte auf Tomate zeigten jedoch, daß sie dann alle die gleichen Symptome in etwa der gleichen Zeit verursachten und daß sie außerdem alle in etwa gleicher Konzentration im Pflanzengewebe enthalten waren. Damit konnte gezeigt werden, daß nicht nur der ursprünglich beobachtete unterschiedliche Zeitverlauf der Symptomausprägung, sondern auch die unterschiedliche Viroid-Konzentration sehr wahrscheinlich von Unterschieden in der Effizienz der Inokulation abhing und daß diese Abweichungen möglicherweise durch Witterungsunterschiede verursacht wurden.

Das Fehlen von Unterschieden in der Symptomausprägung innerhalb der klonierten Population des CEV-CG1 könnte seine Ursache darin haben, daß in der zuvor als Wirtspflanzen verwendeten Komposite Gynura nur diese bestimmte Gruppe von Varianten selektiert wurden.

5.2.4. Die Problematik der Berechnung von RNA Sekundärstrukturen

Die in der vorliegenden Arbeit abgebildeten Sekundärstrukturen wurden von einem Rechenprogramm erstellt, das die dafür benötigten Daten aus einer Zusammenstellung von

Energiewerten bezieht, die bei Basenpaarungen und der Ausbildung von Loops den Energiegehalt des Moleküls beeinflussen. Das Ergebnis dieser Berechnungen ist eine Struktur, die nach thermodynamischen Gesichtspunkten die energieärmste Struktur darstellt. Eine solche Struktur bildet sich z.B. dann aus, wenn das Molekül denaturiert und anschließend sehr langsam wieder renaturiert wird. Solche Bedingungen können bei der biologischen Synthese der Viroide innerhalb der Zelle möglicherweise durch die Mitwirkung bestimmter Proteine geschaffen werden. Die in vitro Transkription zur Erzeugung der Transkript-RNAs, mit denen anschließend die Pflanzen infiziert werden, verläuft jedoch sehr wahrscheinlich auf völlig andere Weise und ohne die Mitwirkung spezieller stabilisierender Proteine. Man kann daher annehmen, daß die in vitro synthetisierten Transkripte nicht die thermodynamisch günstigste Struktur einnehmen, sondern sich viel eher in einer Weise "falten", die sich aus kinetischen Parametern ergibt.

In entsprechenden Versuchen mit dem PSTV konnte tatsächlich gezeigt werden, daß Transkripte, die eigentlich zur Erkrankung der Pflanzen führen sollten und zunächst nicht infektiös waren, nach einer entsprechenden thermischen Behandlung in der Lage waren, eine Infektion auslösen (Tabler, unpubliziert). Ein solches Verhalten könnte z.B. die Ursache dafür sein, daß bei Mutante 14 nur das Dimere, nicht jedoch das Monomere infektiös war.

Aus den unterschiedlichen Auswirkungen von Mutationen an der Pos. 49, die zu den gleichen Änderungen der Sekundärstruktur führen, kann geschlossen werden, daß an dieser Position Wechselwirkungen mit Komponenten der Wirtspflanze erfolgen, da die Unterschiede in der Infektiosität nicht durch die angenommenen Sekundärstrukturen erklärt werden konnten. Wenn man alle diese Ergebnisse zusammenfassend betrachtet, dann läßt sich zwischen dem Verhalten der Transkripte auf den Testpflanzen und ihrer berechneten Sekundärstruktur kein unmittelbar überzeugender Zusammenhang feststellen.

5.3. Erhaltung und Reversion von Mutationen

Die Sequenzierung der CEV-Nachkommenschaft der Transkript-RNAs, die auf Gynura eine Viroidinfektion auszulösen vermochten, hatte gezeigt, daß mit einer Ausnahme die Sequenz dieser Transkripte noch nach ca. 6 Wochen kontinuierlicher Replikation erhalten bleibt, soweit dies durch die verwendete Sequenzierungsmethode nachweisbar ist. Die einzelnen Viroidmutanten sind somit in der Lage, sich unabhängig voneinander zu vermehren. Außerdem zeigt dieses Experiment, daß zur Ausprägung der Symptome kein Gemisch der Sequenzvarianten vonnöten ist, sondern daß dies durch eine einzige Variante erreicht werden kann.

Am Beispiel der Mutante (6) ist ersichtlich, daß es innerhalb der Pflanze durchaus möglich ist, daß zuvor enthaltenen Mutationen im Verlauf der Replikation durch Sequenz-Reversion verloren werden können. Die Infektiosität dieser Variante war dementsprechend auch am geringsten. Es ist zu vermuten, daß im anfänglichen Verlauf der Replikation dieser Variante durch das Zustandekommen von spontanen Mutationen neue CEV-Varianten entstanden sind, die sich schließlich wesentlich besser replizieren konnten als das Ausgangsmaterial, so daß dann doch noch eine Infektion auslöst wurde. Zu diesem Zeitpunkt waren die Pflanzen jedoch schon so alt, daß nur mehr in einigen Fällen eine systemische Infektion erreicht werden konnte. Dieses Ergebnis ist insofern nicht überraschend, als allgemein bekannt ist, daß eine Inokulation von jungen Pflanzen mit Viroiden stets zu einer intensiveren Ausprägung von Symptomen führt als die Inokulation von älteren Pflanzen.

6. Zusammenfassung der Arbeit

Unter Zuhilfenahme molekularbiologischer und gentechnologischer Methoden wurde das Citrus Exocortis Viroid (CEV) kloniert, um Beziehungen zwischen seiner molekularen Struktur und seinen biologischen Funktionen zu untersuchen. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- (1) Nach der Klonierung des vollständigen Genoms des CEV aus zwei unabhängig voneinander gewonnenen Teilstücken zeigte sich, daß die dabei erhaltenen DNA-Formen nicht in der Lage waren, auf verschiedenen Testpflanzen eine CEV-Infektion hervorzurufen. Die nachfolgende Sequenzierung ergab, daß der entsprechende Klon zahlreiche Mutationen im Vergleich zur CEV cDNA aufwies.
- (2) Durch Sequenzierung von Teilklonen wurde die Verteilung von Mutationen innerhalb des CEV-Isolates CG1 ermittelt. Es stellte sich heraus, daß CEV-CG1 aus einem Gemisch von Sequenz-Varianten besteht. Einige Mutationen sind dabei sehr häufig vertreten, während andere oft nur einmal vorkommen. Die häufigen Mutationen befinden sich dabei in einem Bereich, in dem beim PSTV durch Änderungen der Nukleotidsequenz dessen Virulenz moduliert wird.
- (3) Durch Konstruktion von dimeren CEV-DNA-Klonen in Kopf/Schwanz Verknüpfung wurde die Voraussetzung geschaffen, sowohl hochspezifische Hybridisierungsproben zum Nachweis des CEV als auch große Mengen an CEV-Transkript-RNA für nachfolgende Biotests in vitro zu synthetisieren.
- (4) Durch Zusammensetzung von CEV-Teilklonen wurden CEV- Varianten konstruiert, die an definierten Positionen natürlich vorkommende Mutationen tragen. Infektionsversuche mit Transkript-RNA dieser molekular einheitlichen Varianten haben gezeigt, daß von den Neu-Konstruktionen nur einige in der Lage waren, auf Testpflanzen CEV-spezifische Symptome hervorzurufen, während die meisten sich als nicht mehr replikationsfähig erwiesen. Zur Auslösung der CEV-Infektion ist somit kein Gemisch verschiedener CEV-Varianten erforderlich, sondern eine einzige Sequenz-Variante erzielt die gleiche Wirkung
- (6) Eine Analyse des zeitlichen Verlaufs der Sequenz-Variation ergab, daß innerhalb eines halben Jahres nach Inokulation mit kloniertem, genetisch einheitlichen Material keine spontan auftretenden Mutationen nachweisbar waren.

7. Literatur

Andrews, A.T. in
Elektrophoresis

Peacock, A.R., Harrington, W.F. (eds)
Clarendon Press, Oxford (1986)

Ansorge, W. and de Maeyer, L. (1980)
Thermally stabilized very thin (0.02-0.3 mm) poly-acrylamide
gels for electrophoresis
J. Chromatography 202, 45-53

Biebricher, C.K. (1983)
Darwinian Selection of Self-Replicating RNA Molecules
in Evolutionary Biology, Vol. 15
Pecnet, M.K., Wallace, B. and Prance, C.T (eds.)
Plenum Publishing Corporation

Biggin, M.D., Gibson, T.J. and Hong, G.F. (1983)
Buffer gradient gels and ³⁵S label as an aid of rapid DNA
sequence determination
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3963-3965

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening
recombinant plasmid DNA
Nucl. Acids Res. 7, 1513-1522

BRL (Bethesda Research Laboratories) (1983)
Anleitung für die Reinigung von DNA mit Nacs-52TM

Camacho-Henriquez, A. and Sänger, H.L. (1982a)
Gelelectrophoretic analysis of phenol-extractable leaf
proteins from different viroid/host combinations.
Archives of Virology 74, 167-80

Camacho-Henriquez, A. and Sänger, H.L. (1982b)
Analysis of acid-extractable tomato leaf proteins after
infection with a viroid, two viruses and a fungus and partial
purification of a 'pathogenesis-related' protein p14
Archives of Virology 74, 181-93

Cary, P.R., (1977)

New concepts in citrus tree spacing and pruning practices
Proc. Int. Soc. Citricult. 3, 866

Chen, E.Y. and Seeburg, P.H. (1985)

Supercoil sequencing: A fast and simple method for sequencing
plasmid DNA
DNA 4, 165-170

Cohen, M. (1968)

Exocortis virus as a possible factor in producing dwarf citrus
trees
Proc. Fla. State Hort. Soc. 81, 115

Conejero, V. and Semancik, J.S. (1977)

Exocortis viroid: alteration in the proteins of *Gynura
aurantiaca* accompanying viroid infection.
Virology 77, 221

Collins, J. (1980)

Instability of palindromic DNA in *E. coli*.
Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. USA., Vol. XLV, 409-416

Cress D.E., Kiefer M.C. and Owens R.. (1983)

Construction of infectious potato spindle tuber viroid cDNA
clones
Nucl. Acids Res. 11, 6821-6835

Dagert, M. and Ehrlich, S.D. (1979)

Prolonged incubation in calcium chloride improves the
competence of *Escherichia coli* cells
Gene 6, 23-28

Dickson E. Diener T.O. and Robertson H.D. (1978)

Potato spindle tuber and citrus exocortis viroid undergo no
major sequence changes during replication in two different
hosts
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 951-954

Diener T.O. (1971)

Potato spindle tuber "virus". A replicating, low molecular weight RNA

Virology 45, 411-428

Diener, T.O. (1984)

Portrait of Viruses: The Viroids

Intervirology 22, 1-16

Duran-Vila, N., Flores, R. and Semancik, J.S. (1986)

Characterisation of viroid-like RNAs associated with the citrus exocortis syndrome

Virology 150, 75

Domingo E., Martinez-Salas E., Sobrino F., de la Torre J.C., Portela ., Ortin J., Lopes-Galindez C., Perez-Brena P., Villanueva N., Najera R., VandePol S., Steinhauer D., DePolo N. and Holland J. (1985)

The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: Biological relevance - a review

Gene 40, 1-8

Eigen M. (1971)

Self-organisation of matter and the evolution of biological macromolecules

Naturwissenschaften 58, 465-523

Eigen M. and Schuster P. (1977)

The hypercycle - principle of natural self-organisation. Part : Emergence of the hypercycle

Naturwissenschaften 64, 541-565

Freier S.M., Petersheim M. Hickey D.R. and Turner D.H. (1984)

Thermodynamic studies of RNA stability

J. Biomolec. Struct. Dynamics 1, 1229-1242

Freier, S.M., Kierzek, R., Jaeger, J.A., Sugimoto, N.,
Caruthers, M.H., Neilson, T., and Turner, D.H., (1986)
Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex
stability.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9373-9377

Friedrich H. (1980)
Genkartierung und Klonierung von ribosomaler DNS höherer
Pflanzen, Bindungsstudien mit RNS-Polymerase I und Ansätze zur
Strukturgenisolierung aus Sojabohnenzellen
Dissertation, Universität Tübingen

Ghosh P.K., Reddy V.B., Piatak M., Lebowitz P. and Weisman
S.M. (1980)
Determination of RNA sequences by primer directed synthesis
and sequencing of their cDNA transcripts
Meth. Enzymol. 65, 580-595

Grierson, A. in
Gel Electrophoresis of Nucleic Acids
Rickwood, D., Hames, B.D. (eds)
IRL Press New York, (1982)

Gross H.J., Domdey H., Lossow C., Jank P., Raba M., Alberty
H. and Sängner H.L. (1978)
Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle
tuber viroid
Nature 273, 203-208

Haas B. (1984)
Reinigung von synthetischen Desoxyribonukleotiden durch
Polyacrylamidgelelektrophorese
Arbeitsvorschrift

Haas B., Klanner ., Ramm K., Grondinger T. and Sängner H.L.
(1986)
Correlaton between structure and biological properties of
citrus exocortis viroid (CEV)
in Vorbereitung

Hanahan, D. (1983)

Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids
J. Mol. Biol. 166, 557-580

Haseloff, J. and Symons, R.D. (1981)

Chrysanthemum stunt viroid: primary sequence and secondary structure

Nucl. Acid Res. 12, 2741-2752

Haseloff, J., Mohamed, N.A. and Symons, R.H. (1982)

Viroid RNAs of cadang-cadang disease of coconuts.

Nature (London), 299, 316-321

Heinrich P. (1985)

Leitfaden zum schnellen und einfachen Plasmidsequenzieren
Arbeitsvorschrift, Universität München

Herold T. (1986)

Optimierung des spezifischen Nachweises von Potato Spindle
Tuber Viroid (PSTV) (+) und (-) RNA durch molekulare
Hybridisierung und teilweise Charakterisierung einer
zellulären RNA aus gesunden Tomatenpflanzen, die mit PSTV (+)
RNA hybridisiert

Diplomarbeit, Universität Gießen

Holland, J. et al., (1982)

Rapid Evolution of RNA Genomes

Science 215, 1577-1585

Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981)

A rapid boiling method for the preparation of bacterial
plasmids

Anal. Biochem. 114, 193-197

Ishikawa M., Meshi T., Ohno T., Okada Y., Sano T., Ueda I.
and Shikata E. (1984)

revised replication cycle for viroids: The role of longer than
unit length RNA in viroid replication

Mol. Gen. Genet. 196, 421-428

Ishikawa M., Meshi T., Okada Y., Sano T. and Shikata E.
(1985)

In vitro mutagenesis of a infectious viroid cDNA clone
J. Biochem. 98, 1615-1620

Kiefer M.C., Owens R. and Diener T.O. (1983)
Structural similarities between viroids and transposable
genetic elements
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80, 6234-6238

Krämer A., Keller W., Appel B. and Lührmann R. (1984)
The 5'-terminus of the RNA moiety of U1 Small Nuclear
Ribonucleoprotein Particles is required for the splicing of
messenger RNA precursors
Cell 38, 299-307

Mandel, M. and Higa, A. (1970)
Calcium dependent bacteriophage DNA infection
J. Mol. Biol. 53, 154-162

Maniatis T., Fritsch E.F. and Sambrook J. (1982)
Molecular Cloning. Laboratory Manual
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Maxam .M. and Gilbert W. (1980)
Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical
cleavages
Methods Enzymol. 65, 499-560

Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1977)
A new method for sequencing DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560-564

McClements, W.L. and Kaesberg, P., (1977)
Size and secondary structure of potato spindle tuber viroid.
Virology 76, 477-484

McMaster G.K. and Carmichael G.C. (1977)

Analysis of single and doublestranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 4835-4838

Meshi T. Ishikawa M., Watanabe Y., Yamaya J., Okada Y., Sano T. and Shikata E. (1985)

The sequence necessary for the infectivity of hop stunt viroid cDNA clones

Mol. Gen. Genet. 200, 199-206

Meshi T., Ishikawa M., Ohno T., Okada Y., Sano T. Ueda I. and Shikata E. (1984)

Double-stranded cDNAs of hop stunt viroid are infectious J. Biochem. 95, 1521-1524

Messing, J., Crea, R. and Seeburg, P.H. (1981)

A system for shotgun DNA sequencing

Nucl. Acids Res. 9, 309-321

Mizusawa, S., Nishimura, S. and Seela, F. (1986)

Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by use of deoxy-7-deazaguanosine triphosphate in place of dGTP

Nucl. Acids Res. 14, 1319-1324

Mühlbach, H.P., (1987)

Viroide

in Biologie in unserer Zeit, Vol 17, No. 3, 65-78

Müller, W. and Kütemeier, G. (1982)

Size fractionation of DNA fragments ranging from 20 to 30000 base pairs by liquid/liquid chromatography

Eur. J. Biochem. 128, 231-238

Ohno T. Takamatsu N., Meshi T. and Okada Y. (1983)

Hop stunt viroid: Molecular cloning and nucleotide sequence of the complete cDNA copy

Nucl. Acids Res. 11, 6185-6197

Okayama H. and Berg P. (1982)
High-efficiency cloning of full-length cDNA
Mol. Cell Biol. 2, 161-170

Owens R. and Cress D.E. (1980)
Molecular cloning and characterisation of potato spindle tuber
viroid cDNA sequences
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 4471-4474

Owens R. and Diener T.O. (1981)
Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid
disease by nucleic acid hybridisation
Science 213, 670-672

Owens R., Hammond R.W., Gardner R.C., Kiefer M.C., Thompson
S.M. and Cress D.E. (1986)
Site specific mutagenesis of potato spindle tuber viroid cDNA:
Alterations within premelting region 2 that abolish
infectivity
Pl. Mol. Bio. 6, 179-192

Palukaitis P. and Symons R.H. (1978)
Synthesis and characterisation of complimentary DNA probe for
chrysanthemum stunt viroid
FEBS Lett. 92, 268-272

Peters D. and Runia W.T. (1985)
in Maramorosch K. and McKelvey J.J. (eds.), Subviral Pathogens
in Plants and Animals: Viroids and Prions
The host range of viroids
Academic Press, Orlando, San Diego, New York, London;
pp. 21-39

Öfversted, L.G., Hammarström, K., Balgobin, N., Hjerten, S.,
Pettersson, U. and Chattopadhyaya, J. (1984)
Rapid and quantitative recovery of DNA fragments from gels by
displacement electrophoresis (isotacho-phoresis)
Biochim. Biophys. Acta 782, 120-126

Poncz, M., Solowiejczyk, D. Ballantine, M., Schwartz, E. and Surrey, S. (1982)

"Non-random" DNA sequence analysis in bacteriophage M13 by dideoxy chain termination method

Proc. Natl. Sci. USA 79, 4298-4302

Priefer, U. (1984)

Isolation of plasmid DNA

In: Pühler, A. und Timmis, K.N. (Hrsg.) Advanced Molecular Genetics, Springer Verlag, Berlin, 14-26

Riesner D. and Gross H.J. (1985)

Viroids

Ann. Rev. Biochem. 54, 531-564

Rohde W., Schnölzer M. and Sängner H.L. (1981b)

Sequence-specific priming of the in vitro synthesis of DNA complementary to citrus exocortis viroid

FEBS Lett. 130, 208-212

Rohde W., Schnölzer M., Rackwitz H.R., Haas B., Seliger H. and Sängner H.L. (1981a)

Specifically primed synthesis in vitro of full-length DNA complementary to potato spindle tuber viroid

Eur. J. Biochem. 118, 151-157

Sammons D.W., Adams L.D. and Nishizawa E.E. (1981)

Ultrasensitive silver-based color staining of polypeptides in polyacrylamide gels

Electrophoresis 2, 135-141

Sanger F. and Coulson .R. (1978)

The use of thin acrylamid gels for DNA sequencing

FEBS Lett. 87, 107-110

Sanger F., Nicklen S. and Coulson .R. (1977)

DNA sequencing with chain terminating inhibitors

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467

Sanger, F. and Coulson, A.R. (1978)

The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing
FEBS Lett. **87**, 107-110

Sano T., Ohshima K., Hataya T., Uyeda I., Shikata E., Chou T.G., Meshi T. and Okada Y (1986)

Viroid resembling hop stunt viroid in grapevines from Europe, the United States and Japan
J. gen. Virol. **67**, 1673-1678

Sano T., Uyeda I., Shikata E., Ohno T. and Okada Y. (1984)

Nucleotide sequence of cucumber pale fruit viroid: Homology to hop stunt viroid
Nucl. Acids Res. **12**, 3427-3434

Sänger H.L. (1972)

An infectious and replicating RNA of low molecular weight: The agent of the exocortis disease of citrus
Adv. Biosci. **8**, 103-116

Sänger H.L. (1982)

in Parthier B. and Boulter D. (eds.) Encyclopedia of Plant Physiology New Series, Vol 14B Nucleic Acids and Proteins in Plants II

Biology, structure, functions and possible origin of viroids
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York; pp. 368-454

Sänger H.L. (1986)

in Diener T.O. (ed.) , The Viroids
The replication of viroids
Plenum Press, New York; (in press)

Sänger H.L., Klotz G., Riesner D., Gross H.J. and

Kleinschmidt . K. (1976)

Viroids are single stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly basepaired rod like structures
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**, 3852-3856

Vieira, J. and Messing, J. (1982)

The pUC plasmids, an M13 mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primer
Gene 19, 259-268

Visvader J.E. and Symons R.H. (1983)

Comparative sequence and structure of different isolates of citrus exocortis viroid

Virology 130, 232-237

Visvader J.E. and Symons R.H. (1985)

Eleven new sequence variants of citrus exocortis viroid and the correlation of sequence with pathogenicity

Nucl. Acids Res. 13, 2907-2920

Visvader J.E. and Symons R.H. (1986)

Replication of in vitro-constructed viroid mutants: Location of the pathogenicity-modulating domain of citrus exocortis viroid

EMBO J., in press

Visvader J.E., Forster .C. and Symons R.H. (1985)

Infectivity and in vitro mutagenesis of monomeric cDNA clones of citrus exocortis viroid indicates the site of processing of viroid precursors

Nucl. Acids Res. 13, 5843-5856

Visvader J.E., Gould .R., Bruening G.E. and Symons R.H.

(1982)

Citrus exocortis viroid: Nucleotide sequence and secondary structure of an Australian isolate

FEBS Lett. 137, 288-292

Wobus U. (edt.) (1980)

Isolierung, Fraktionierung und Hybridisierung von Nukleinsäuren

Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Basel

Tabler M. and Sänger H.L. (1985)

Infectivity studies on different potato spindle tuber viroid (PSTV) RNAs synthesized in vitro with the SP6 transcription system

EMBO J. 4, 2191-2199

Tabler M., Schnölzer M. and Sänger H.L. (1985)

Molecular cloning of potato spindle tuber viroid (PSTV) cDNA synthesized by enzymatic elongation of PSTV-specific DNA primers: general strategy for viroid cloning

Biosci. Rep. 5, 143-158

Tsagris, M., Hillmann, M., Linker, W., Tabler, M. and Sänger, H.L. (1987)

Processing of viroids of the PSTV-group in extracts of host and non-host cells

in RNA Processing, Cold Spring Harbour, New York

Tsagris, M., Tabler, M., Mühlbach, H.P., and Sänger, H.L. (1987)

Linear oligomeric potato spindle tuber viroid (PSTV) RNAs are accurately processed in vitro to the monomeric circular viroid proper when incubated with a nuclear extract from healthy potato cells.

EMBO J. 6, 2173-2183

Van Dorst H.J.M. and Peters D. (1974)

Some biological observations on pale fruit, a viroid-incited disease of cucumber

Neth. J. Plant Path. 80, 85-96

Van Wezenbeck P., Vos P., van Boom J. and van Kammen . (1982)

Molecular cloning and characterisation of a complete DNA copy of potato spindle tuber viroid RNA

Nucl. Acids Res. 10, 7947-7957

Vektor Cloning Systems (1985)

General protocols for Bluescribe vectors

Arbeitsvorschrift

Schuster, P. (1983)

Evolution - Von Molekülen zu Gesellschaften: Teil I.
Dynamik der Polynukleotidreplikation
Physik in unserer Zeit 14, 66-80

Shikata E. (1985)

in Maramorosch K. and McKelvey J.J. (eds.) Subviral Pathogens
of Plants and Animals: Viroids and Prions
Hop stunt viroid and hop stunt disease
Academic Press, Orlando, San Diego, New York, London;
pp. 101-123

Smith, H.O. (1980)

Recovery of DNA from gels
In: Grossmann, L. and Moltave, K. (Hrsg.) Methods in Enzymology,
Academic Press, New York, Vol. 65, 371ff

Southern E.M. (1975)

Detection of specific sequences among DNA fragments separated
by gel electrophoresis
J. Mol. Biol. 98, 503-517

Stellwag E.T. and Dahlberg .E. (1980)

Electrophoretic transfer of DNA, RNA and protein onto
diazobenzylloxymethyl(DBM)-paper
Nucl. Acids Res. 8, 299-317

Tabler M. (1983)

Klonierung und Sequenzierung von Potato Spindle Tuber Viroid
(PSTV) cDNA
Diplomarbeit, Universität Tübingen

Tabler M. and Sänger H.L. (1984)

Cloned single- and double-stranded DNA copies of potato
spindle tuber viroid (PSTV) RNA and co-inoculated subgenomic
DNA fragments are infectious
EMBO J. 3, 3055-3062

Sänger H.L., Ramm K., Domdey H., Gross H.J., Henko K. and Riesner D. (1979)

Conversion of circular viroid molecules to linear strands
FEBS Lett. 99, 117-122

Sänger, H.L. (1982)

Biology, structure, functions and possible origin of viroids
in: Parthier, B. and Boulter, D. (Hrsg.) Encyclopedia of Plant
Physiology New Series, Springer Verlag Berlin, Vol. 14B
Nucleic Acids and Proteins in Plant II, 368-454

Sänger, H.L. (1984)

Minimal infectious agents: the viroids
in: Mahy, B.W.J. and Pattison, J.R. (Hrsg.) The Microbe, Part I
Viruses, Society for General Microbiology Symposium 36,
Cambridge University Press, 281-334

Schleicher und Schüll

Arbeitsanleitung für die Minisäulen Elutip-dTM

Schlemmer, A., Roistacher, C.N., and Semancik, J.S. (1985)

A unique infectious RNA associated with citron showing
symptoms typical for citrus exocortis disease
Phytopathology 75, 946

Schnölzer, M., Haas, B., Ramm, K., Hofmann, H. and Sänger, H.L.
(1985)

Correlation between structure and pathogenicity of potato
spindle tuber viroid (PSTV)
The EMBO J. 4, 2181-2190

Schnölzer-Rackwitz M. (1985)

Beziehung zwischen der molekularen Struktur des Viroids der
Kartoffelspindelknollensucht (PSTV) und seiner Pathogenität.
Dissertation, Universität Ulm

Schumacher, J., Sänger, H.L. and Riesner, D. (1983)

Subcellular localisation of viroids in highly purified nuclei
from tomato leaf tissue
The EMBO J. 2, 1549-1555

Yanisch-Péron C., Vieira J. and Messing J. (1985)
Improved M13 phage cloning vectors and host strains:
Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors
Gene 33, 103-119

Young, R.C.-A., Lis, J. and Wu, R. (1979)

Elution of DNA from gels after electrophoresis
In: Wu, R. (Hrsg.) Methods in Enzymology, Academic Press, New
York, Vol. 68, 176ff

Zuker M. and Sankoff D. (1984)

RNA secondary structures and their prediction
Bulletin of Mathematical Biology 46, 591-621

Lebenslauf

Persönliche Daten

Matthias Hillmann,
geb. am 9.12.57 in Hildesheim als 2. Kind des Physikers
E.Hillmann und der Lehrerin Christa,
ledig

Ausbildung

- Mai '76 Schulabschluß mit Abitur am Gymnasium Alfeld
- ab Juli '76 Ableistung des Grundwehrdienstes
- ab Okt. '77 Grundstudium der Chemie an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz
- Sept. '80 Abschluß der Diplom-Vorprüfungen
- ab Okt. '80 Hauptstudium der Chemie mit Schwerpunkt Biochemie an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg
- ab Okt. '82 Beginn des Grundstudiums der Volkswirtschaftslehre
- Mai '83 Abschluß der mündlichen Diplom-Hauptprüfungen im Fach Chemie
- März '84 Abschluß der Diplomarbeit auf dem Gebiet der biophysikalischen Chemie mit dem Thema:
Kinetische und thermodynamische Untersuchungen zur Phasenumwandlung des Systems DMPA/Cholesterin
- April '84 Abschluß der Diplom-Vorprüfungen im Fach Volkswirtschaftslehre
- ab Mai '84 Doktorarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. H.L.Sänger am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried

München, den 30.9.87

